ANNALES
DE
L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES AGRONOMIQUES
SERVICE DE
8 MAI 1964
DOCUMENTATION
5383
VERSAILLES

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (1), 5-32.

DÉTERMINATION DES SUCRES RÉSIDUELS DES VINS, LEUR RELATION AVEC LA FERMENTATION MALOLACTIQUE

PREMIÈRE PARTIE

N. MELAMED.

Station de Technologie végétale, Versailles (Seine et Oise).

SOMMAIRE

Après une étude bibliographique portant sur les divers sucres résiduels des vins et les méthodes de détection et de dosage, on a été amené à mettre au point une technique nouvelle. La préparation de l'échantillon a été particulièrement étudiée ; elle met en jeu une défécation, un passage sur échangeurs d'ions, une précipitation à l'alcool des gommes et des pectines, et une cryodessiccation. L'analyse qualitative est faite par chromatographie sur papier et les divers sucres sont dosés par les méthodes spécifiques suivantes. Le glucose est déterminé enzymatiquement par la glucose-oxydase, le fructose par réaction colorée à la diphénylamine. Le xylose et l'arabinose sont dosés par élution des taches après séparation chromatographique sur papier. Cette technique a été appliquée à divers échantillons de vins, elle a permis de mettre en évidence des quantités appréciables de glucose quelquefois égales à celles du fructose. On a pu aussi montrer que la teneur en sucres réducteurs diminue dans les vins qui ont effectué la fermentation malolactique.

INTRODUCTION

Les vins doux, comme les vins secs, subissent souvent après la fermentation alcoolique et pendant le stockage, une fermentation secondaire appelée aussi fermentation malolactique. Celle-ci n'est pas le fait des levures, mais de bactéries de la famille des *Lactobacillaceae*, dites bactéries malolactiques, qui réalisent la transformation de l'acide malique apporté par le moût en acide lactique suivant la réaction globale :

$$CO_2H - CH_2 - CHOH - CO_2H \rightarrow CH_3CHOH - CO_2H + CO_2 - 6 \text{ Cal.} \quad (1)$$

Cette fermentation peut se manifester dans un délai variable :
— pendant la cuvaison, ou peu de temps après,
— pendant le printemps ou l'été suivant,
— après une ou deux années de conservation.

Elle entraîne une diminution de l'acidité totale des vins, dont l'effet est d'autant plus heureux que leur acidité initiale était plus grande, ce qui est généralement

le cas pour les vins des régions septentrionales. D'autre part, la fermentation malolactique améliore encore la qualité des vins en agissant sur les points suivants :

— l'assouplissement,

— la disparition du caractère acerbe à la dégustation,

— le goût, le bouquet et la couleur.

SCHANDREL (1950) a pu écrire que dans les vignobles septentrionaux, la fermentation malolactique était aussi importante que la fermentation alcoolique.

Il n'est pas sans intérêt de rappeler ici, que nos idées sur la désacidification qui se produit dans les vins ont considérablement évolué depuis les premières observations faites à ce sujet.

BERTHELOT et FLEURIEU (1864), BOUSSINGAULT (1866) et d'autres auteurs l'attribuent à la précipitation du tartre ; mais cette explication est manifestement insuffisante. KULISCH (1897), AMTHOR (1889), WORTMANN (1894), émirent l'hypothèse que les levures pouvaient consommer les acides tartrique et malique lorsqu'elles n'ont plus de sucre à leur disposition. PEYNAUD (1947) a montré dans une expérience de laboratoire que dans un moût contenant 113 mg d'acide malique, les levures pouvaient en faire disparaître 13 à 24 p. 100.

Mais c'est MULLER-THURGAU (1890) (1913) qui montra le premier que la désacidification des vins était due principalement à l'action de bactéries spécifiques, qui transforment l'acide malique en acide lactique. Les résultats furent confirmés par KOCH (1897) et SEIFERT (1901).

A partir de ce moment, les véritables agents de la désacidification étaient trouvés ; il ne restait plus qu'à les dénombrer et à préciser les conditions dans lesquelles ils opèrent. Mais celles-ci sont loin d'être bien connues et la fermentation malolactique reste encore en œnologie un phénomène très capricieux.

Il serait évidemment avantageux que la fermentation malolactique suive immédiatement la fermentation alcoolique, car la mise en bouteille de vin contenant encore de l'acide malique peut être préjudiciable à sa bonne conservation. En effet, lorsqu'elle se produit dans la bouteille, il s'ensuit un trouble et un dégagement de gaz carbonique fort désagréable pour certains types de vins.

Des chercheurs ont essayé de déterminer certains facteurs susceptibles de déclencher ce processus capricieux ; mais le problème est loin d'être résolu.

Or, des expériences que RADLER (1958) a réalisées avec *Lactobacillus arabinosus* et que nous avons vérifiées à la Station de Technologie végétale à Versailles — nous ayant montré que ces ferments ne peuvent pas pousser dans un milieu complètement dépourvu de sucre (même si celui-ci contient des quantités appréciables d'acide malique), nous avons pensé que les ferments malolactiques utilisent pour leur développement des sucres résiduels se trouvant dans les vins secs.

Cette idée nous a été suggérée par le fait que la réaction (1) est une réaction endothermique. Il est donc nécessaire que les bactéries malolactiques puissent se procurer l'énergie indispensable à leur développement à partir d'un autre substrat.

Pour mettre cette hypothèse à l'épreuve, nous avons procédé à l'identification et au dosage des sucres résiduels sur une trentaine d'échantillons de vins dont les uns avaient déjà effectué leur fermentation malolactique et dont les autres ne l'avaient pas encore faite. Ce travail nous a conduit à confronter les différentes méthodes de dosage des sucres résiduels et à mettre au point des analyses délicates.

En complément de ces recherches, nous avons étudié la croissance de deux sou-

ches de bactéries lactiques en présence de divers sucres résiduels : xylose, arabinose, glucose et fructose, seuls ou en mélange. L'une de ces souches est *Lactobacillus arabinosus* que nous avons déjà utilisée avec DUPUY (1959) dans un travail antérieur et que nous avons choisie parce qu'elle est d'une culture facile et qu'elle a un métabolisme actif, qui permet de mettre en évidence des phénomènes difficilement décelables avec des espèces à croissance plus limitée. L'autre souche a été isolée d'un vin en fermentation malolactique.

Notre exposé comportera donc deux parties :

— La première est relative à l'historique des travaux antérieurs, au choix des méthodes analytiques, et aux résultats que nous avons obtenus sur une trentaine d'échantillons de vins ;

— La seconde est consacrée à l'étude de la croissance de deux souches de bactéries et de leur comportement vis-à-vis de divers sucres.

Dans la conclusion, nous ferons connaître l'ensemble de nos observations.

CHAPITRE I

SUCRES RÉSIDUELS DES VINS

Tous les vins, même ceux dont la fermentation est complètement terminé contiennent de petites quantités de glucides qui constituent ce que l'on appelle l sucres résiduels. Ces sucres sont réducteurs et forment deux groupes : ceux qui so fermentescibles et ceux qui ne le sont pas.

Les premiers sont constitués par des hexoses : glucose et fructose, voire exceptio nellement, du saccharose.

Les seconds sont des pentoses, dont l'importance décroît dans l'ordre : arabinos xylose et rhamnose.

Nous allons examiner rapidement l'origine de ces sucres et donner quelques ind cations sur leur teneur dans les vins.

1. — Saccharose

La présence naturelle de petites quantités de saccharose dans le moût de raisi est passée inaperçue pendant longtemps et lorsqu'on le trouvait dans le vin, o concluait au sucrage de la vendange. Mais il est établi aujourd'hui que le saccharo peut être présent dans le jus de raisin naturel ; en particulier, on peut le trouver e quantité assez importante dans certains hybrides. Or, ce diholoside se trouve inver par la sucrase de la levure au cours de la fermentation. Kielhofer et Amman (195 ont montré que cette inversion était complète après quelques heures. La présen de saccharose dans le vin semble donc peu probable. Sa recherche a cependant co duit à des résultats contradictoires : Babo et Mach (1896), Sebastian (1909 Alwood (1910), Clavero et Lopez (1932) concluent à l'absence de saccharose, tand que Muttelet (1930) en trouve de 0,24 à 0,38 g/l dans des vins doux de Porto, Lobstein et Schmitt (1931) en trouvent de 0,6 à 1,5 g/l dans les vins d'Alsac Kielhofer et Amman (1956) admettent que de faibles quantités de saccharose pou raient se former ultérieurement dans les vins contenant plus de 5 g/l de sucres ré duels, par suite de la recombinaison du glucose et du fructose en milieu acide.

2. — Glucose et fructose

Ces deux hexoses qui constituent la majeure partie de la fraction sucrée du j de raisin disparaissent au cours de la fermentation suivant les processus de Meye hof et de Warburg, pour donner de l'alcool et de l'anhydride carbonique. En pri cipe, il ne devrait plus en rester dans le vin fait. L'analyse montre pourtant qu'il reste toujours de faibles quantités. Leur présence semble due à un ralentissement l'activité des levures au fur et à mesure que le degré alcoolique s'élève, car elle est général d'autant plus importante que le moût initial était plus riche en sucre.

De nombreux travaux, parmi lesquels nous citerons ceux de GAYON et DUBOURG (1890), SZABO et RACKSANYI (1935), SISAKIAN et MARUTIAN (1948) ont établi que dans le moût, le rapport $\frac{\text{glucose}}{\text{fructose}}$ était voisin de 1,4 au début de la maturation et qu'il tendait vers 1 à la fin. GAROGLIO et BARINI-BANCHI (1940) confirment ces observations et établissent en outre qu'au stade de surmaturation, ce rapport devient plus petit que 1, c'est-à-dire qu'il y a davantage de fructose que de glucose.

Mais en ce qui concerne la disparition de ces sucres au cours de la fermentation les auteurs ne sont pas d'accord. C'est ainsi qu'ALFA (1933), trouve que le fructose disparaît plus vite que le glucose, tandis que DUBOURG (1897) aboutit à une conclusion inverse. PEYNAUD et DOMERCQ (1955), en poursuivant les travaux de GAYON et de DUBOURG, concluent à l'influence des levures. Ils ont proposé pour celles-ci ce classement basé sur les vitesses de fermentation du glucose et du fructose :

1° Levures faisant fermenter 80 à 85 p. 100 du glucose lorsque 50 p. 100 du fructose a disparu.

2° Levures ne faisant fermenter que 5 à 10 p. 100 du glucose lorsque 50 p. 100 du fructose a disparu.

3° Levures qui attaquent les deux sucres avec une vitesse identique.

Ce classement paraît surtout valable pour les vins de Sauternes qui ont été particulièrement étudiés par ces auteurs, car les observations les plus fréquentes montrent que les sucres résiduels des vins contiennent généralement plus de fructose que de glucose. Ce phénomène reste d'ailleurs difficile à expliquer étant donné que dans le schéma de la fermentation alcoolique, le glusoce passe sous la forme d'ester diphosphorique du fructofuranose (ester de HARDEN et YOUNG), ce qui semblerait devoir entraîner d'abord la disparition du fructose.

3. — PENTOSES

Le problème de l'origine des pentoses et des substances assimilées telles que les pentosanes, dans le vin, n'est pas complètement résolu. Il semble qu'ils aient été signalés pour la première fois par COMBONI (1896). RAVENA et ZAMORANE (1911) considèrent comme inadmissible qu'ils puissent se former à partir des hexoses simples. Avant eux, TOLLENS (1896) avait supposé que les pentosanes provenaient d'une oxydation directe de l'amidon ou de la cellulose par action de l'oxygène atmosphérique en présence de ferments spécifiques. WATTIEZ et STERNON (1942) admettent comme possible une oxydation des hexoses en acides oniques est uroniques, qui seraient transformés en pentoses avec dégagement d'anhydride carbonique sous l'effet de certaines bactéries ; les pentoses formés se polymériseraient ensuite en osanes.

Plus tard, on a reconnu la présence de pentosanes sur la membrane du fruit. Ceux-ci sont suceptibles de passer en solution comme l'ont montré les travaux de BUCHI et DEUEL (1945). Ces auteurs ont isolé à partir de 400 litres de jus de raisin *Vitis vinifera* cépage *Rauschling*, avec un rendement de 0,014 p. 100, un polysaccharide acide ayant un poids moléculaire de 1 000. Ce polysaccharide est réducteur et donne par hydrolyse :

galactose 34 p. 100, mannose 19,5 p. 100, arabinose 15,9 p. 100, rhamnose 12 p. 100.

Nous verrons par la suite que les différents auteurs ne sont pas d'accord sur la

présence de rhamnose dans les vins. Nos recherches ont confirmé ces observations car, sur une trentaine d'échantillons étudiés, le rhamnose n'a été trouvé qu'une seule fois.

Les levures n'ont d'ailleurs pas seulement une action destructrice sur les sucres fermentescibles ; elles peuvent également synthétiser à partir de divers métabolites des polyosides. C'est ainsi que MAGER (1947) a précipité par de l'alcool, dans un milieu où s'étaient développés *Torulopsis rotundata, Torulopsis neoformans*, ainsi que d'autres levures formant des capsules, un polyholoside contenant 85 p. 100 de pentoses constitués surtout de xylose, et de 15 p. 100 d'hexoses fermentescibles formés surtout de glucose.

Quoiqu'il en soit, les travaux de TARANTOLA (1948) ont montré que la majeure partie des sucres réducteurs non fermentescibles du vin, est constituée par des pentoses avec une nette prédominance d'arabinose. Ces pentoses préexistent dans le jus de raisin, car il est parfaitement établi qu'ils ne sont pas fermentescibles dans les conditions normales de la vinification. Toutefois, TAMAKI (1948) signale que 20 p. 100 de xylose peuvent être fermentés par certaines levures sauvages et il a identifié dans les produits de la fermentation : des acides fixes et volatils, de l'éthanol, des aldéhydes, du furfurol et des cétones. Mais cette fermentation est assez exceptionnelle puisque PELLET (1916) a utilisé la propriété des pentoses d'être infermentescibles, pour mettre au point une méthode de dosage du xylose et de l'arabinose dans les mélasses sucrières, c'est-à-dire en présence de saccharose, de raffinose, de glucose, de fructose et de mannose, en précisant toutefois que les quantités de pentoses doivent rester faibles devant celles des autres sucres.

Les tableaux suivants donnent une idée des limites entre lesquelles peuvent varier les quantités de sucres résiduels dans différents types de vins.

TABLEAU I

Détermination des sucres réducteurs dans les vins secs, par divers auteurs.

Auteurs	Couleur des vins	Nombre d'échantillons	Valeurs extrêmes g/l	Moyenne g/l
LOBSTEIN et SCHMITT (1931)	—	19	0,85-8,00	—
VON DER HEIDE et BURKARD (1935)	—	17	0,72-5,67	1,94
TARANTOLA (1948) (1950)	rouge	13	1,3-5,1	2,9
	blanc	7	1,0-1,4	1,2
	rouge	60	0,36-5,90	1,82
	blanc	7	0,60-1,75	0,84
PEYNAUD (1950)	rouge	6	1,8-2,9	2,2
	blanc	1	3,2	3,2
GUICHARD (1954)	rouge	6	0,35-1,10	0,77
	blanc	7	0,48-4,05	1,38

TABLEAU 2

Teneurs en glucose et en fructose dans les vins secs, données par divers auteurs.

Auteurs	Couleur	Nombre d'échantillons	Fructose g/l		Glucose g/l	
			valeurs extrêmes	moyenne	valeurs extrêmes	moyenne
Von der Heide et Burkard (1935)	—	17	0,20-5,00	1,12		
Godet et Martin (1946)	—	—	0,22-0,36	—	0,24-0,37	
Genevois et coll. (1949)	blanc	1	2,5	2,5	0,2	0,2
Peynaud (1950)	rouge blanc	6 1	1,0-1,5 0,5	1,2 0,5	0,1-0,7 0,2	0,4 0,2
Tarantola (1950)	—	6	0,30-1,62	0,74	0-0,96	0,38

TABLEAU 3

Dosage des pentoses dans les vins secs, par divers auteurs.

Auteurs	Couleur des vins	Nombre d'échantillons	Valeurs extrêmes g/l	Moyenne g/l
Comboni (1896)	rouge blanc	— —	0,64-1,32 0,46-0,67	— —
Wittmann (1901)	—	—	0,41-0,48	—
Scurti (1910)	—	—	0,95-1,77	—
Schaffer et Arbenz (1914)	rouge blanc	3 4	0,62-1,21 0,73-0,94	0,88 0,80
Von der Heide et Burkard (1935)	—	17	0,50-1,22	1,10
Toricelli (1941)	blanc	41	0,43-1,14	0,62
Genevois et Coll. (1949)	—	1	0,5	0,5
Garino-Canina (1943)	—	—	0,30-0,85	—
Tarantola (1950)	rouge blanc rouge blanc	13 7 63 8	0,70-1,80 0,50-0,75 0,47-1,99 0,36-1,22	1,13 0,67 1,08 0,7
Peynaud (1950)	rouge blanc	6 1	0,5-0,7 0,5	0,6 0,5
Jaulmes (1951)	rouge	5	0,4-1,3	—
Guichard (1954)	rouge blanc	8 4	0,30-1,04 0,42-0,83	0,73 0,57

CHAPITRE II

CRITIQUE ET CHOIX DES MÉTHODES ANALYTIQUES UTILISÉES

I. — Caractérisation préliminaire des vins étudiés

Les échantillons de vins que nous avons étudiés, au nombre d'une trentaine nous ont été fournis par les Stations oenologiques des diverses régions de France C'étaient tous des vins réputés secs, contenant par conséquent un minimum minimorum de sucres résiduels.

Pour caractériser rapidement chacun d'eux, nous avons déterminé dès leur réception : le degré alcoolique, le pH, l'acidité fixe et volatile, l'absence ou la présence d'acide malique ou lactique, et les sucres réducteurs totaux. Ces analyses sont trop classiques en œnologie pour qu'il soit nécessaire de les traiter en détail. Mais comme pour chacune d'elles il existe plusieurs méthodes, nous indiquerons celles que nous avons choisies.

1° *Degré alcoolique*

Il a été déterminé par la méthode de Semichon et Flanzy (1930) légèrement modifiée par Cordebard (1939). Elle consiste à oxyder l'alcool distillé par l'appareil de Jaulmes (1951), au moyen d'un excès de solution sulfochromique de titre connu. L'excès de bichromate est déterminé en ajoutant de l'iodure de potassium et en dosant l'iode libéré au moyen de l'hyposulfite de sodium.

Pour obtenir des résultats précis par cette méthode, il est nécessaire d'attendre 3 minutes après l'introduction de l'iodure, la libération de l'iode n'étant pas instantanée. En outre, il faut effectuer un dosage à blanc dans des conditions rigoureusement identiques et faire la différence des deux mesures.

2° *Acidité totale*

Elle a été déterminée au moyen de la soude N/10 en présence de rouge de phénol sur du vin préalablement décarboniqué par agitation dans le vide. Le virage a été examiné par touches.

3° *Acidité volatile*

Elle a été déterminée par entraînement à la vapeur d'eau après addition d'acide tartrique dans le vin, selon la méthode de Jaulmes. Le distillat est ensuite neutralisé par la soude N/10 en présence de phénol phtaléine. L'acide sulfureux, qui a été entraîné en même temps que les acides volatils, est ensuite dosé sur ce même distillat par iodométrie, d'abord en milieu acide pour connaître la fraction libre, puis en milieu alcalin pour connaître la fraction combinée à l'éthanal. L'une et l'autre interviennent dans la correction de l'acidité volatile brute.

4° *Sucres réducteurs totaux*

Ils ont été dosés au moyen de la liqueur de FEHLING par la méthode classique de G. BERTRAND, sur le vin préalablement déféqué comme il sera dit plus loin.

5° *Acides malique et lactique*

Pour savoir si un vin a subi une fermentation malolactique, il suffit de s'assurer de l'absence d'acide malique. Dans ce cas, une détermination qualitative de cet acide suffit. La méthode de chromatographie sur papier des acides organiques décrite par CHEFTEL, MUNIER et MACHEBŒUF (1951), nous a permis d'y parvenir très rapidement.

Le solvant contient du propanol-eucalyptol-acide formique (5-5-2) saturé d'eau ; l'acide formique étant destiné à faire rétrograder l'ionisation des acides déposés dans la tache. L'élimination des acides volatils après séparation est facilitée par la présence d'eucalyptol dans le solvant.

Après séchage la révélation est obtenue par une solution alcoolique de bleu de bromophénol. Les acides présents dans le vin ayant des Rf (rapport entre le déplacement du corps et celui du solvant) assez différents, il est possible d'obtenir une séparation suffisante en faisant une chromatographie ascendante sur une hauteur de 25 cm.

La figure 4 montre le schéma d'un chromatogramme obtenu en suivant cette technique.

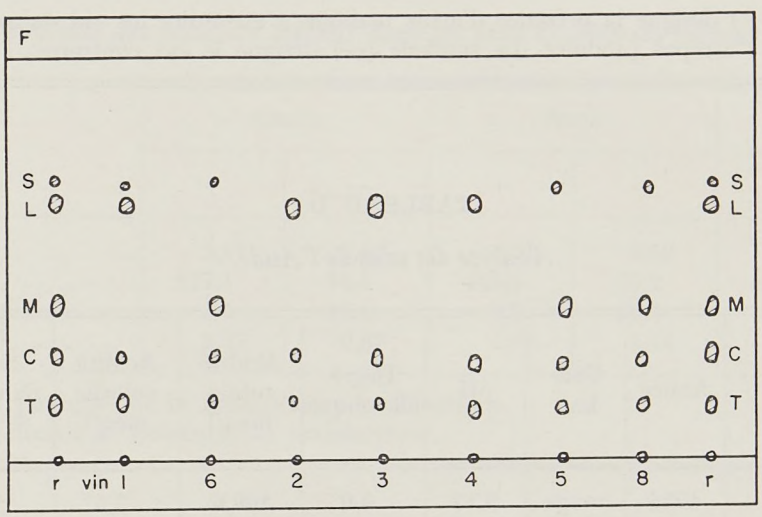


FIG. 4. — *Chromatogramme des acides organiques suivant la technique de* CHEFTEL *et coll., (1951).*

Les lettres en majuscules représentent les acides suivants : Tartrique — Citrique — Malique — Lactique et Succinique. *r* = tache de référence. F = front du solvant.

Quant à la détermination du pH nous l'avons faite avec un potentiomètre P. V. de M. E. C. I. avec une électrode de verre.

Les résultats de ces premières analyses qui constituent, en quelque sorte, la la fiche d'identité des vins mis en expérience, sont donnés par les tableaux 5, 6, 7 et 8. Ils sont groupés par régions, et pour chaque région les échantillons ont été répartis en deux groupes suivant qu'ils avaient fait ou non leur fermentation malolactique. Tous les chiffres de ces tableaux sont des moyennes correspondant à plusieurs dosages. D'ores et déjà, on peut se rendre compte que les vins qui ont fait leur fermentation malolactique contiennent moins de sucres réducteurs que ceux qui ne l'ont pas faite.

TABLEAU 5

Analyse des vins d'Alsace.

N°	Cépages	Année	Couleur	pH	Degré alcoolique	Acidité totale meq/l	Acidité volatile meq/l	Sucres réducteurs g/l	Fermentation malolactique(1)
1	Chasselas	1954	blanc	3,50	10,3	65,2	10,4	0,74	—
2	Pinot blanc	—	—	3,40	8,9	76,4	10,2	0,71	—
3	Pinot gris	—	—	3,55	11,6	83,8	10,4	0,80	—
4	Sylvaner	—	—	3,45	9,6	80,2	10,5	1,03	—
5	Riesling	—	—	3,15	11,9	120,6	10,9	2,50	+
6	Pinot blanc	1955	—	3,54	10,8	140,0	6,2	3,17	+
7	Riesling	1956	—	3,02	9,6	148,8	5,5	3,32	+
8	Riesling	—	—	2,92	10,8	128,4	8,9	2,36	+
9	Riesling	—	—	3,02	10,7	125,4	9,1	1,74	+
10	Chasselas	—	—	3,20	10,0	95,4	8,2	1,23	+
11	Chasselas	—	—	3,19	10,1	94,6	9,1	2,00	+
12	Pinot gris	—	—	3,27	11,7	105,4	10,0	2,65	+

(1) Le symbole (+) désigne la présence d'acide malique, c'est-à-dire un vin dans lequel la fermentation malolactique ne s'est pas produite. Le symbole (—) désigne le cas contraire.

TABLEAU 6

Analyse des vins de l'Aude.

N°	Origine	Année	Couleur	pH	Degré alcoolique	Acidité totale meq/l	Acidité volatile meq/l	Sucres réducteurs g/l	Fermentation malolactique(1)
1	Coursan	1956	rouge	3,13	9,0	108,6	7,5	2,25	+
2	Coursan	—	—	3,28	9,3	114,2	11,8	1,92	+
3	Coursan	—	—	3,15	8,2	107,8	5,0	2,05	+
4	Coursan	—	—	3,16	8,2	108,2	8,1	1,98	+
5 (2)	Narbonne	1957	—	3,55	10,3	71,6	10,9	1,66	—
6 (2)	—	—	—	3,32	11,2	95,4	10,0	2,00	+
	—	—	—	3,40	11,1	76,8	10,6	1,37	—

(1) Voir tableau 5.
(2) Les vins 5 et 6 sont préparés à partir de raisins provenant de la même vigne.
Le 5 était vinifié par macération carbonique, le 6 par macération ordinaire.
Les résultats du vin n° 6 sont reproduits avant et après la fermentation malolactique.

TABLEAU 7

Analyse des vins de Gaillac, Bordeaux, Jura et Beaujolais.

N°	Provenance	Cru	Année	Couleur	pH	Degré alcoolique	Acidité totale meq/l	Acidité volatile meq/l	Sucres réducteurs g/l	Fermentation malolactique (1)
1	Gaillac	Labastide de Levis	1957	blanc	3,41	12,1	57,2	17,3	2,44	—
2	—	—	—	—	3,38	10,7	55,5	14,3	3,75	—
3	—	—	—	—	3,06	9,5	81,6	14,9	2,61	+
4	—	—	1958	—	3,08	10,5	88,3	11,5	2,75	+
5	—	Cunac	—	rouge	3,40	11,0	69,3	14,2	1,31	—
6	Bordeaux	St-Estèphe	1957	—	3,32	10,6	81,4	15,5	2,84	—
7	—	St-Émilion	—	—	3,22	11,4	81,4	13,0	3,93	—
8	Jura	Arbois	1958	—	3,28	11,8	86,2	9,2	1,61	—
9 (2)	Beaujolais	Liergues	1957	—	2,95	13,0	121,2	8,3	1,95	+
	—	—	—	—	3,25	13,1	109,7	9,0	0,74	—

(1) Voir le tableau 5.
(2) Le même vin avant et après fermentation malolactique.

TABLEAU 8

Moyenne des résultats obtenus dans les vins de diverses régions.

	Alsace		Aude		Gaillac	
	+	—	+	—	+	—
pH	3,17	3,42	3,21	3,50	3,07	3,39
Acidité totale meq/l	117,1	76,4	106,8	74,2	84,9	60,6
Acidité volatile meq/l	8,4	10,4	8,5	10,8	13,2	15,8
Sucres réducteurs g/l	2,37	0,82	2,04	1,51	2,68	2,49

(+) vin n'ayant pas effectué la fermentation malolactique.
(—) vin ayant effectué la fermentation malolactique.

2. — Préparation des échantillons

Pour poursuivre notre travail dans le sens indiqué dans l'introduction, il était nécessaire de connaître les proportions relatives de chacun des sucres résiduels. Or, le vin est un milieu trop complexe pour que ces dosages puissent être effectués directement sur lui. Il est nécessaire d'en tirer une solution aussi pure que possible et amenée à une concentration suffisante pour assurer la précision des dosages. Pour cela il a été soumis à la série d'opérations suivantes :

1° *Défécation*

Cette opération a pour but d'éliminer la majeure partie des matières azotées, des gommes et pectines, des matières colorantes et des tanins, etc., dont il convient de signaler que certains possèdent une action réductrice sur la liqueur de Fehling.

Les principaux agents de défécation sont le sous-acétate de plomb et le sulfate o acétate mercurique. On a reproché au sous-acétate de plomb d'introduire une erreu par suite d'une adsorption de fructose dans le précipité.

La méthode au sulfate ou à l'acétate mercurique fournit une solution très limpid sans perte de sucre, et qui assure une élimination presque complète des gommes e des pectines. Nous avons adopté la méthode à l'acétate mercurique, recommandé par JAULMES (1951).

Nous avons effectué la clarification en deux temps. Le premier est une centrifu gation qui élimine la majeure partie du précipité, la seconde est une filtration lent à travers un papier filtre. Entre les deux opérations nous avons ajouté un peu d poudre de zinc pour éliminer l'excès de mercure susceptible de produire des précipi tations ultérieures.

Sur la solution parfaitement limpide, il devient possible de doser les sucre réducteurs totaux par la méthode de FEHLING modifiée par G. BERTRAND ou pa l'une de ses variantes.

2° *Déminéralisation*

Nous étant proposé d'effectuer une séparation quantitative des sucres par chro matographie, la simple défécation était une purification insuffisante. Deux procédé s'offraient à nous pour pousser plus loin la purification :

a) L'extraction des sucres au moyen de la pyridine à chaud selon une méthod préconisée par MALPRESS et MORRISON (1949), et déjà appliquée au cas du vin pa GUICHARD (1954).

b) Le traitement aux échangeurs d'ions comme l'ont déjà fait PARTRIDGE (1948) MERS, BEAUFAYS et DUVE, (1953) et MONTREUIL (1957).

Nous avons choisi ce deuxième procédé parce qu'il a l'avantage d'éliminer com plètement les électrolytes dont on sait qu'ils nuisent beaucoup à la netteté des tache chromatographiques, ce que nous avons d'ailleurs vérifié nous-même.

Une étude préliminaire des différentes résines échangeuses d'ions était nécessaire En effet, les résines fortement basiques attaquent les sucres aldéhydiques avec for mation d'acides et les résines très acides peuvent dédoubler le saccharose en glucos et fructose.

Notre choix s'est porté sur le Dowex 50 pour l'échangeur de cations et l'Amber lite IR 45 pour l'échangeur d'anions.

Nos colonnes étaient constituées par des tubes burettes de 1,6 cm de diamètre et 100 cm de haut. Avant d'être introduite dans les tubes, chaque résine a été trempé dans l'eau distillée. Le remplissage limité à 90 cm de hauteur doit être conduit d façon à ne pas introduire d'air. On achève le remplissage de chaque colonne avec 1 cm de laine de verre.

Nous avons constaté que, lors du passage de la liqueur déféquée les sucres com mencent à apparaître dans le filtrat après écoulement de 7 ml et qu'après 22 ml la concentration du filtrat en sucres totaux est la même que celle de la liqueur initiale En conséquence, nous avons, par mesure de précaution, rejeté les 50 premiers ml et recueilli 400 ml après passage sur la première colonne, et 300 ml après passage sur la seconde. Cette façon de conduire l'opération est infiniment supérieure à la technique classique qui consiste à laver les colonnes pour récupérer la totalité des sucres ce qui

conduit à une dilution extrêmement gênante.

Le tableau suivant indique les concentrations des sucres totaux après déminéralisation pour une solution particulièrement altérable de fructose à 4 g par litre, et pour un vin déféqué.

	Sol. fructose	Vin
	—	—
Après défécation	3,95	1,93
Après passage sur Dowex 50	3,93	1,92
Après passage sur Amberlite IR 45	3,93	1,93

On peut donc bien conclure que le passage d'une solution sucrée sur les résines choisies n'apporte aucune modification aux sucres présents.

3° *Concentration par cryodessiccation*

Nous avons effectué la concentration par la technique de cryodessiccation, qui consiste en une congélation suivie d'une sublimation dans le vide. En effet, l'évaporation par ébullition est à déconseiller formellement et la concentration au bain-marie est excessivement longue.

Notre dispositif expérimental comporte une pompe à 2 étages Micropal B2 débitant 2 m^3 heure sous la pression atmosphérique et donne une pression limite de 1×10^{-3} mm de Hg. On procède d'abord à une congélation en couches minces de l'échantillon (250 ml) dans un tube plongeant dans un récipient thermostatique contenant un mélange d'alcool et de neige carbonique. Le tube est ensuite relié à la partie interne d'un vase de DEWAR, en acier inoxydable, rempli de mélange alcool et neige carbonique. Puis on fait le vide. Le récipient intérieur de DEWAR joue le rôle de condensateur sur lequel l'eau vient se condenser sous forme de givre. Il faut environ six heures pour éliminer l'eau de 250 ml.

Le résidu de cette évaporation est transvasé dans un tube à centrifuger à l'aide de 15 ml d'eau distillée. On ajoute alors 35 ml d'alcool absolu. Cette opération a pour but de précipiter les dernières traces de gommes et de pectines restant après défécation. On centrifuge et le précipité est lavé 3 fois avec 10 ml d'alcool à 70°. Les solutions alcooliques sont rassemblées et concentrées rapidement par distillation au bain-marie sous vide dans un petit ballon. Le résidu est ensuite ajusté exactement à 10 ml avec de l'eau distillée. C'est cette solution que nous avons utilisée dans tous nos dosages ultérieurs.

En résumé, 500 ml de vin ont donné 550 ml de liqueur déféquée dont on a prélevé 250 ml après déminéralisation. Les 250 ml ont été ensuite ramenés à 10 ml. La concentration en sucre est donc :

$$\frac{500 \times 250}{550 \times 10} = 22{,}75 \text{ fois plus grande que celle dont on est parti.}$$

3. — DOSAGE DES SUCRES RÉSIDUELS

La chromatographie conduite comme nous l'indiquerons plus loin, permet une séparation des différents sucres résiduels. Elle constitue un excellent moyen d'analyse qualitative pouvant être le point de départ d'un dosage par découpage et élution des différentes taches. Nous avons réservé cette dernière technique au dosage des pentoses. Nous avons préféré doser directement le fructose et le glucose sur l'échan-

tillon de vin déféqué et concentré, le premier par colorimétrie et le second par voi enzymatique.

Remarquons auparavant que le dosage des sucres réducteurs totaux effectué nouveau sur ces échantillons a fourni des résultats inférieurs à ceux qui ont ét trouvés directement sur les vins non concentrés. L'écart maximum trouvé atteignai 15 p. 100. Ces pertes proviennent des nombreuses manipulations qui prennent plac entre la première prise d'essai et l'obtention de l'échantillon purifié et concentré Pour corriger cet écart, nous avons multiplié chaque fois les valeurs individuelle obtenues, par un facteur de correction. Ce facteur est calculé en faisant le rapport de sucres réducteurs dosés dans les vins aux sucres réducteurs dosés dans l'échantillo final.

1° *Dosage colorimétrique du fructose*

Parmi les nombreuses méthodes de dosage de fructose, celle qui nous a paru l plus satisfaisante est celle de DISCHE (1953), utilisant la coloration bleue produit par la diphénylamine en milieu chlorhydrique. Cette réaction est d'une extrême sensi bilité et elle est parfaitement spécifique à condition d'opérer sur des solutions suffi samment diluées pour éviter toute influence du glucose et des pentoses.

La composition du réactif est la suivante :

Alcool	5 ml
Diphénylamine	500 mg
Acide acétique	45 ml
Acide chlorhydrique concentré	50 ml

Le mode opératoire est le suivant :

Dans un volume de solution contenant de 10 à 50 γ de fructose, on ajoute volumes de réactif. Le mélange effectué dans des tubes bouchés, est chauffé au bain marie bouillant pendant 10 minutes très exactement. Les tubes sont ensuite refroidi dans l'eau et on détermine la densité optique de son contenu dans des tubes de 1 cm d'épaisseur. On opère avec le colorimètre muni d'un filtre à 630 mμ.

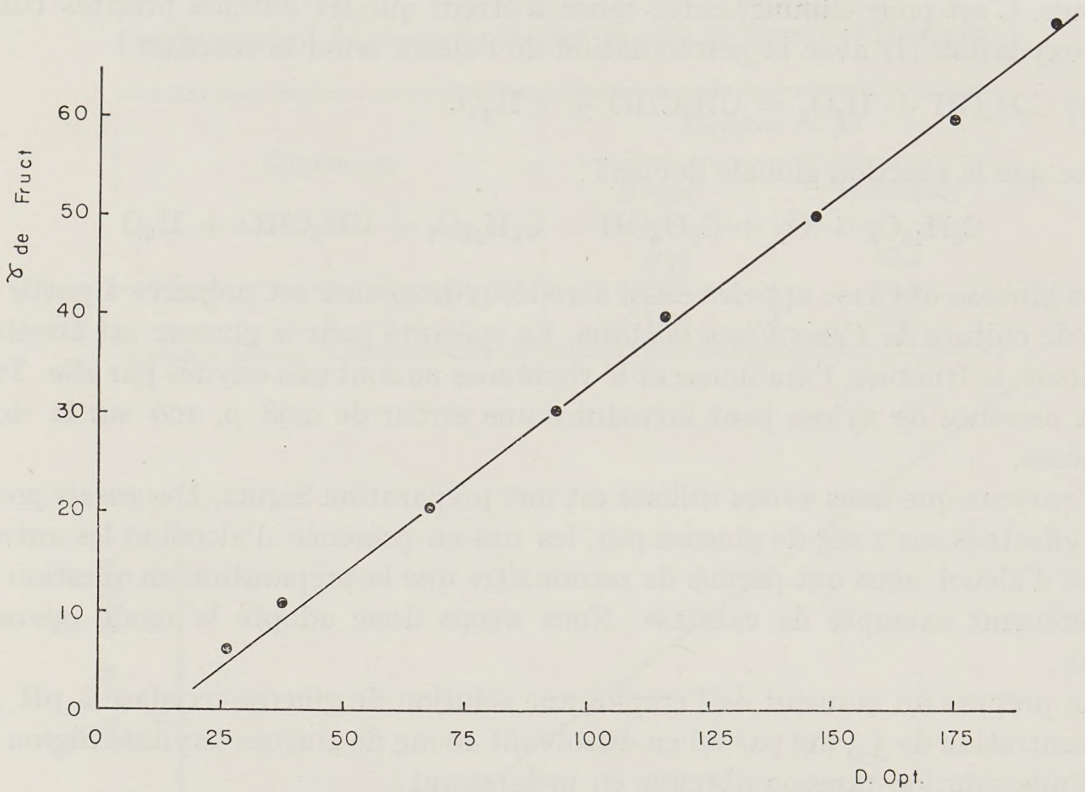
TABLEAU 9

Courbe standard du fructose en suivant la méthode de DISCHE (*1953*)

Fructuose en γ	Densité optique
5	0,026
10	0,238
20	0,068
30	0,094
40	0,116
50	0,148
60	0,176
70	0,198

Cette méthode suppose évidemment l'établissement préalable d'une courb standard établie à partir de solution aqueuse de fructose pur contenant 100 mg dans laquelle on prélève successivement des volumes correspondants à 5, 10, 20... 70 de fructose.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 9 et traduits par la courbe qui l'accompagne. On remarquera que, pour des concentrations en fructose comprises entre 5 et 70 γ, la coloration suit la loi de BEER-LAMBERT. Pour toutes nos mesures ultérieures, nos prises d'essai ont été choisies pour rester dans ces limites.



Nous avons vérifié en outre, que la présence de pentoses dans nos échantillons n'apportait pas de perturbation au dosage. Le tableau 10 dressé pour l'arabinose montre que la présence de ce pentose est sans effet sensible.

TABLEAU 10

Influence de l'arabinose sur le dosage colorimétrique du fructose.

En γ dans la prise d'essai		Densité optique par rapport au témoin
Fructose	Arabinose	
0	0	0
50	0	0,148
50	60	0,146
50	120	0,146
50	240	0,144

2° *Dosage enzymatique du glucose*

Cette méthode est due à KEILIN et HARTREE (1945). L'application que nous en avons faite aux vins nous a donné entière satisfaction. Elle est basée sur la détermination manométrique de l'oxygène employé pour l'oxydation enzymatique du glucose par la glucose-oxydase suivant l'équation :

(1) $C_6H_{12}O_6 + O_2 + H_2O = H_2O_2 + C_6H_{12}O_7$ (acide gluconique).

D'après cette équation, il faut 124,4 µl d'oxygène pour oxyder 1 mg de gluco
Le pH le plus favorable est égal à 5,6.

Les préparations habituelles de glucose-oxydase contiennent souvent de la ca
lase qui décompose l'eau oxygénée en libérant de l'oxygène moléculaire ce qui fau
le dosage. C'est pour éliminer cette cause d'erreur que les auteurs précités comp
tent l'oxydation (1) avec la peroxydation de l'alcool selon la réaction :

(2) $C_2H_5OH + H_2O_2 = CH_3CHO + 2\ H_2O$.

de sorte que la réaction globale devient :

$$C_6H_{12}O_6 + O_2 + C_2H_5OH = C_6H_{12}O_7 + CH_3CHO + H_2O$$

La glucose-oxydase appelée aussi aérodéshydrogénase est préparée à partir d'
milieu de culture de *Penicillium notatum*. La spécifité pour le glucose est étroite.
saccharose, le fructose, l'arabinose et le rhamnose ne sont pas oxydés par elle. Tou
fois, la présence de xylose peut introduire une erreur de 0,98 p. 100 sur le dosa
du glucose.

L'enzyme que nous avons utilisée est une préparation Sigma. Des essais préli
naires effectués sur 2 mg de glucose pur, les uns en présence d'alcool et les autres
absence d'alcool, nous ont permis de reconnaître que la préparation en question ét
complètement exempte de catalase. Nous avons donc adopté le mode opérato
suivant :

On prépare au moment de l'emploi une solution de glucose-oxydase à pH 5,6
la concentration de 3,3 mg par ml en dissolvant 10 mg de glucose-oxydase Sigma da
3 ml d'une solution tampon obtenue en mélangeant :

Phosphate disodique 0,4 M	5 ml
Phosphate monopotassique 0,4 M	95 ml

Dans le compartiment principal des fioles de l'appareil de WARBURG on intr
duit la prise d'essai de solution sucrée concentrée, telle qu'elle contient environ 2 m
de glucose. On ajoute de la soude 10 N de façon à ramener le pH au voisinage de 5
déterminé au rouge de méthyle ou au papier indicateur Lyphan, puis on ajou
0,7 ml de la solution tampon et on complète le volume à 2,7 ml avec de l'eau bidistill
On introduit alors 0,3 ml de la solution enzymatique dans le diverticule des fiol

Celles-ci après avoir été reliées au manomètre sont plongées dans le thermostat
30°. La température est stabilisée au bout d'un quart d'heure environ. A ce mome
on mélange le contenu des fioles en maintenant tous les robinets fermés.

Une fiole appelée thermobaromètre ne contient que 3 ml d'eau. Elle permet
corriger la variation de pression due aux changements éventuels de température
de pression atmosphérique.

Calcul. Soit :

KO_2, le coefficient de la fiole à la température de 30° pour le volume de 3 ml ;

d, la dénivellation en mm lue sur le manomètre ;

On a en appelant µl O_2 le volume d'oxygène absorbé en µl,

$$\mu l\ O_2 = KO_2 \times d.$$

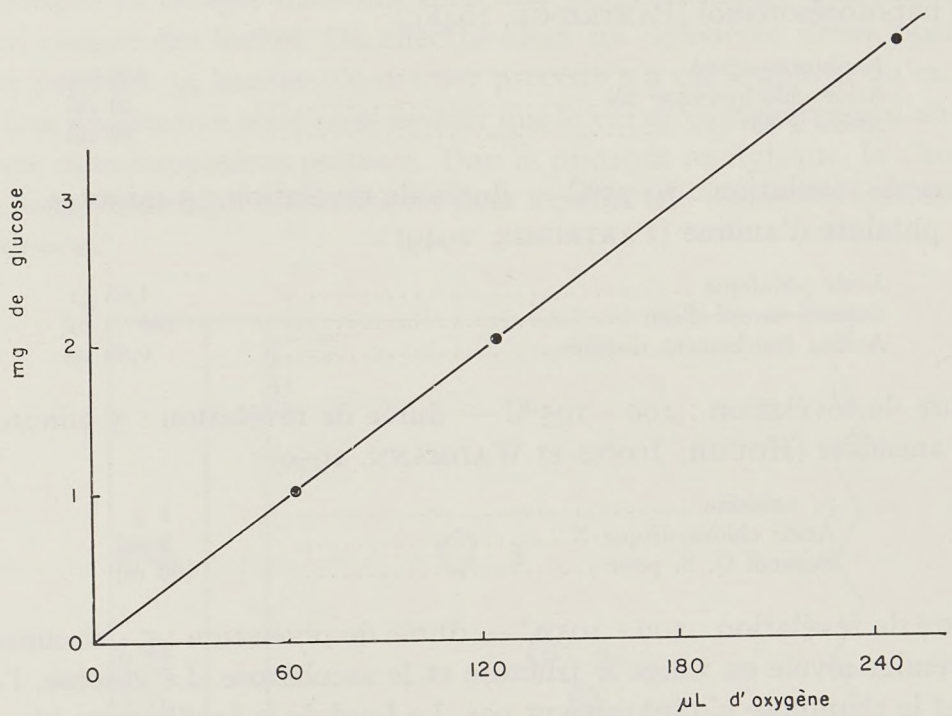
Pour effectuer les dosages, il fallait évidemment établir une courbe standa
Nous l'avons fait à partir d'une solution de glucose pur à 4 pour 1 000 dont nous av

prélevé successivement 0,25, 0,50 et 1 ml correspondant respectivement à 1,2 et 4 mg de glucose. Les valeurs trouvées et les valeurs théoriques sont rassemblées dans le tableau II et la courbe jointe.

TABLEAU II

Courbe standard du glucose en suivant la méthode KEILIN *et* HARTREE.

Glucose mg	Oxygène en µl	
	Mesuré	Théorique
1	60,6	62,2
2	122,7	124,4
4	245,8	248,8



4. — SÉPARATION DES SUCRES PAR CHROMATOGRAPHIE

GUICHARD (1954) a signalé que la méthode chromatographique semblait être l'une des meilleures pour caractériser les sucres réducteurs des vins. Nous nous sommes adressés à cette méthode pour la séparation des sucres et nous l'avons appliquée au dosage des différents pentoses sur les échantillons purifiés et concentrés comme nous l'avons dit précédemment. Le premier problème qui se posait, était le choix d'un solvant et d'un révélateur.

1. — *Solvant*

Nous avons étudié les solvants suivants :

a : alcool amylique saturé d'eau ;

b : solvant de PARTRIDGE (1948) : butanol + ammoniaque à 1 p. 100 + eau (50 ; 5 ; 45). ;

c : solvant de DEDONDER (1952) : butanol + éthanol + eau (4 ; 1,1 ; 1,9).

d : solvant de GALANTI (1958) : benzène + butanol + pyridine + eau + acide acétique (1 ; 5 ; 3 ; 3 ; 1).

Les deux derniers se sont montrés les plus intéressants et c'est le solvant de DEDONDER que nous avons adopté en raision de sa simplicité.

Les Rf trouvés pour ce solvant sur papier Whatman n°1 sont indiqués dans le tableau suivant :

Saccharose	0,155	Arabinose	0,266
Glucose	0,225	Xylose	0,300
Fructose	0,260	Rhamnose	0,400

2. — *Révélateur*

Nous avons expérimenté les révélateurs suivants :

a) au naphtorésorcinol (PARTRIDGE, 1948) :

Naphtorésorcinol.....	100 mg
Acide chlorhydrique 2N	20 ml
Alcool à 95°	80 ml

température de révélation : 70-75°C — durée de révélation : 5 minutes.

b) au phtalate d'aniline (PARTRIDGE, 1949) :

Acide phtalique	1,63 gr
Butanol saturé d'eau	100 ml
Aniline fraîchement distillée	0,93 ml

température de révélation : 100 - 105°C — durée de révélation : 5 minutes.

c) à l'anisidine (HOUGH, JONES et WADMANN, 1950) :

p. anisidine	1 g
Acide chlorhydrique N	8 ml
Butanol Q. S. pour	100 ml

température de révélation : 100 - 105°C — durée de révélation : 5 - 10 minutes.

Le premier révèle en rouge le fructose et le saccharose. Le glucose, l'arabinose, le xylose et le rhamnose n'apparaissent pas. Le fond de la feuille reste blanc.

Le second révèle le xylose et l'arabinose en lie de vin, tandis que le saccharose, le glucose, le fructose et le rhamnose se révèlent en ocre. Le fond de la feuille reste blanc.

Le troisième révèle le xylose et l'arabinose en lie de vin, tandis que le glucose et le rhamnose sont révélés en ocre. Le fructose et le saccharose ne sont pas révélés. Le fond de la feuille vire au beige.

Nous avons utilisé ces trois révélateurs pour la détermination qualitative des sucres et le dernier seulement pour le dosage du xylose et de l'arabinose en apportant toutefois une modification de la concentration en acide chlorhydrique.

Avant de décrire notre mode opératoire ,signalons que certains auteurs proposent pour séparer les substances de Rf voisins, la technique du développement multiple. Elle consiste à faire passer le solvant à plusieurs reprises sur le papier dans la même direction en séchant celui-ci contre deux passages. Cette technique est d'une efficacité relative et elle a l'inconvénient de provoquer un étalement des taches.

Nous avons préféré le procédé qui consiste à laisser le solvant s'écouler goutte à

goutte au bas de la feuille. Il est plus rapide et donne de meilleurs résultats. Pour l'appliquer dans de bonnes conditions, il convient de découper en franges le bord inférieur de la feuille.

Pour repérer la position des sucres avant la révélation, nous avons disposé à chaque extrémité de la ligne de départ une tache de pourpre de bromocrésol dont le Rf est supérieur à celui du rhamnose ; le Rf de ce dernier étant supérieur à celui de tous les autres sucres présents. L'écoulement est arrêté 5 heures après l'élimination de la tache pourpre. La durée totale du développement est de 54 heures. A ce moment la tache de rhamnose se trouve à quelques cm de l'extrémité de la feuille (57 × 46 cm), de telle sorte que si l'on continuait le développement, ce méthylpentose risquerait d'être éliminé.

Pour obtenir une meilleure séparation, il faut faire un chromatogramme à deux dimensions (fig. 12), c'est-à-dire qu'après un premier développement la feuille est séchée, découpée en franges dans une direction perpendiculaire à la première sur le bord le plus éloigné des taches. On effectue alors un deuxième développement avec écoulement pendant 34 heures. Ce dernier procédé n'a été employé qu'en vue de la détermination qualitative pour nous assurer que le vin ne contenait pas d'autres sucres que ceux que nous supposions présents. Dan la pratique analytique, la chromatographie à une seule dimension est suffisante pour assurer une bonne séparation du xylose et de l'arabinose.

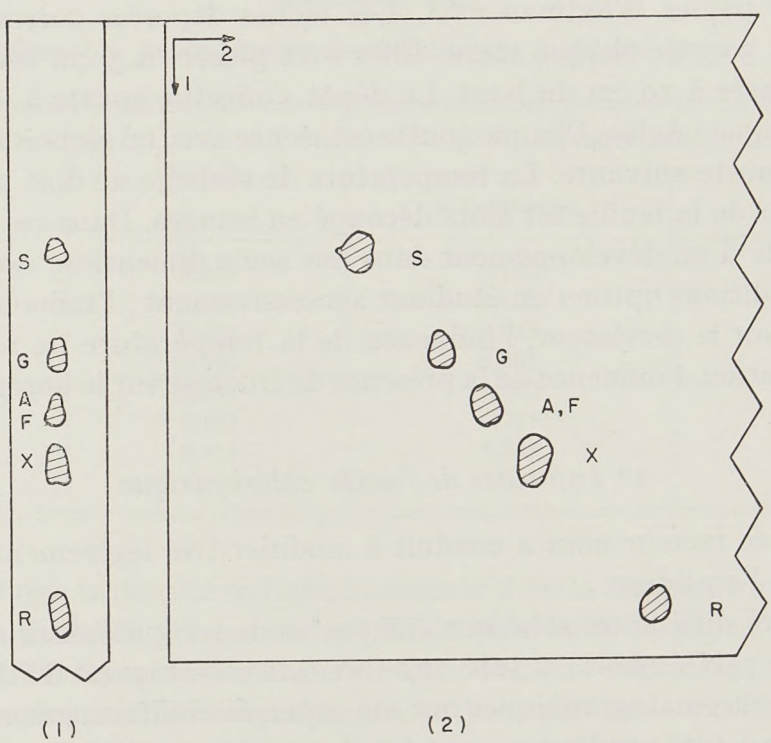


FIG. 12. — *Chromatogrammes obtenus à partir du saccharose* (S) — *glucose* (*G*) — *arabinose* (*A*) — *fructose* (*F*) — *xylose* (*X*) — *rhamnose* (*R*) *en une* (1) *et en deux dimensions* (2) *avec le solvant de* DEDONDER.

5. — DOSAGE DU XYLOSE ET DE L'ARABINOSE.

Jusqu'ici la plupart des auteurs se sont contentés d'évaluer globalement les pentoses par différence entre les sucres réducteurs totaux et les hexoses et d'expri-

mer les résultats en arabinose. GUICHARD (1954) a le premier essayé de déterminer le proportions relatives de ces deux sucres en comparant la grosseur des taches à celle de témoins. Mais ces résultats étaient approximatifs. PRIDHAM (1956), a constaté que les spots obtenus avec le révélateur à l'anisidine pouvaient être élués au moyen de la solution suivante :

Chlorure stanneux	1 g
Eau distillée	5 ml
Méthanol	90 ml

Le chlorure stanneux stabilise la coloration qui en son absence est assez fugace. C'est cette méthode que nous avons utilisée en découpant les taches de xylose et d'arabinose sur une surface de 9 cm2 qu'on traite par 3 ml de la solution en agitant de temps en temps pendant une demi-heure. La solution obtenue est transvasée dans les tubes calibrés d'un colorimètre Lumeton (modèle 402 - E) et on détermine la densité optique avec le filtre à 515 m μ.

Essais préliminaires.

Nous avons vérifié l'exactitude de la méthode sur des solutions de sucres purs. Nous avons préparé à cet effet trois solutions contenant chacune 5 g/l de l'un des sucres suivant : arabinose, xylose et fructose que nous avons chromatographiées et développées sur papier Whatman n° 1. Les taches déposées correspondent à 10 μl de solution, soit 50 γ de chaque sucre. Elles sont placées à 5 cm les unes des autres sur une ligne tracée à 10 cm du bord. Le dépôt s'effectue goutte à goutte au moyen d'une microseringue « Agla ». Chaque goutte est séchée avec un séchoir à air chaud avant de déposer la goutte suivante. La température de séchage ne doit pas dépasser 50°. Le bord inférieur de la feuille est alors découpé en franges. Dans ces essais nous nous sommes contenté d'un développement dans une seule dimension, nous proposant de chercher les conditions optima en étudiant successivement : l'influence de la concentration en ClH sur le révélateur, l'influence de la température de révélation, la stabilité de la coloration, l'influence de la présence de fructose sur le dosage de l'arabinose.

1° *Influence de l'acide chlorhydrique*

L'étude de ce facteur nous a conduit à modifier très légèrement la composition du révélateur à l'anisidine.

On a préparé différentes solutions composées de : 1 g d'anisidine, 10 ml de ClH (1 N - 0,85 N - 0,75N - 0,60N - 0,50N - 0,25N - 0,125N) et 90 ml d'éthanol.

Les bandes chromatographiques ont été aspergées uniformément et révélées par séchage à l'étuve à 105° pendant 10 minutes. Les taches sont découpées et éluées dans les conditions précédemment indiquées. On détermine alors la densité optique des éluats. Un essai à blanc est indispensable.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 13.

Ce tableau montre que les taches ne se révèlent pas pour des concentrations en ClH inférieures à 0,25 N. Le contraste maximum entre la tache et le fond est obtenu par le réactif préparé avec de l'acide à 0,6N. C'est cette concentration que nous avons adoptée pour tous nos dosages.

TABLEAU 13

Influence de l'acide chlorhydrique sur la densité optique.

ClH	Témoin	Densité optique due à l'arabinose	Densité optique due au xylose
0,125 N	—	—	—
0,25	0,097	0,082	0,105
0,50	0,090	0,157	0,170
0,60	0,090	0,160	0,210
0,75	0,074	0,161	0,186
0,85	0,061	0,089	0,085
1,00	0,052	0,027	0,034

2° *Influence de la température de révélation*

Des expériences conduites comme les précédentes avec le révélateur à l'anisidine à l'acide chlorhydrique 0,6N, ont fourni des taches qui ont été séchées à l'étuves à diverses températures avant d'être éluées. Les moyennes des résultats obtenus sont rassemblées dans le tableau 14.

TABLEAU 14

Influence de la température de révélation sur la densité optique.

Température en °C	Témoin	Densité optique due	
		à l'arabinose	au xylose
94	0,048	0,180	0,198
97	0,051	0,190	0,220
102	0,053	0,232	0,279
105	0,094	0,255	0,282
110	0,097	0,302	0,349
120	0,101	0,311	0,347
130	0,113	0,328	0,371

On en déduit que la densité optique augmente avec la température de révélation. Mais à partir de 110° l'accroissement est faible et le fond du papier commence à se colorer fortement. La température de 110° doit donc être considérée comme optima. Nous l'avons adoptée pour tous nos dosages, en la maintenant exactement pendant 10 minutes pour que les divers résultats restent comparables.

3° *Stabilité de la coloration*

Des éluats obtenus dans les conditions précédentes sont examinés au colorimètre de 10 minutes en 10 minutes.

Les moyennes des résultats obtenus sur 4 expériences sont rassemblées dans le tableau 15.

TABLEAU 15

Stabilité de la coloration en fonction du temps.

Temps en minutes	Témoin	Arabinose	Xylose	Densité optique due	
				à l'arabinose	au xylose
10	0,148	0,423	0,498	0,275	0,350
20	0,148	0,413	0,482	0,265	0,334
30	0,134	0,403	0,472	0,269	0,338
40	0,124	0,401	0,463	0,277	0,339
50	0,125	0,402	0,463	0,277	0,338
60	0,123	0,397	0,453	0,274	0,330
70	0,120	0,387	0,445	0,267	0,325
80	0,120	0,383	0,440	0,263	0,320
90	0,120	0,377	0,431	0,257	0,311
100	0,115	0,364	0,414	0,259	0,299
110	0,115	0,356	0,400	0,241	0,285
120	0,110	0,342	0,390	0,232	0,280

La densité optique est pratiquement fixe entre 0 et 60 minutes. Elle diminu ensuite lentement. Il est donc nécessaire d'examiner la solution dans l'heure qui su l'élution.

4° *Influence du fructose*

Nous avons déjà indiqué précédemment qu'avec le solvant de DEDONDER (195 le Rf de l'arabinose est très voisin de celui du fructose. Il nous a paru important de no rendre compte de l'influence que ce dernier pouvait avoir sur le dosage de l'arabinos

A cet effet, nous avons établi deux feuilles chromatographiques. Sur l'une, on déposé un mélange de 50 γ d'arabinose et de 50 γ de xylose et sur l'autre on a déposé même mélange auquel on a ajouté 50 γ de fructose. Les deux feuilles sont traité dans les mêmes conditions. Les résultats sont rapportés dans le tableau 16.

TABLEAU 16

Influence du fructose sur la coloration due à l'arabinose.

	Présence de fructose				Absence de fructose			
	1	2	3	moyenne	1	2	3	moyen
Arabinose	0,256	0,245	0,249	0,250	0,237	0,234	0,237	0,236
Xylose	0,275	0,275	0,265	0,272	0,237	0,258	0,256	0,259

On constate que sur la même feuille la reproductibilité de la méthode est satis faisante, puisque la plus grande différence observée est de 3,7 p. 100 dans le cas d xylose. Au contraire, les variations d'une feuille à l'autre sont plus importantes. Mai si l'on compare les moyennes des résultats obtenus avec le xylose qui n'est pa influencé par la présence du fructose, en raison des écarts de Rf, on constate que la diffé rence n'est que de 5 p. 100, c'est-à-dire qu'elle est égale et de même sens que pou l'arabinose. On peut donc en conclure que la présence de fructose n'influe pas sensi blement sur les résultats du dosage de l'arabinose.

En résumé, la technique opératoire de dosage est la suivante :

On dépose à l'aide de la microseringue « Agla » un volume connu de l'échantillon (préparé comme il a été dit précédemment) sur la ligne tracée à 10 cm de la base de la feuille chromatographique. Le chromatogramme à une dimension est développé avec le solvant de DEDONDER (1952) pendant 54 heures. On sèche, on asperge la solution d'anisidine chlorhydrique et on révèle les taches à l'étuve à 110°C, pendant 10 minutes exactement. Les taches correspondant à l'arabinose et au xylose sont découpées sur une surface de 9 cm^2 et éluées avec 3 ml de la solution méthylique de chlorure stanneux. Enfin, on détermine la densité optique au colorimètre à 515 mμ dans la première heure qui suit l'élution.

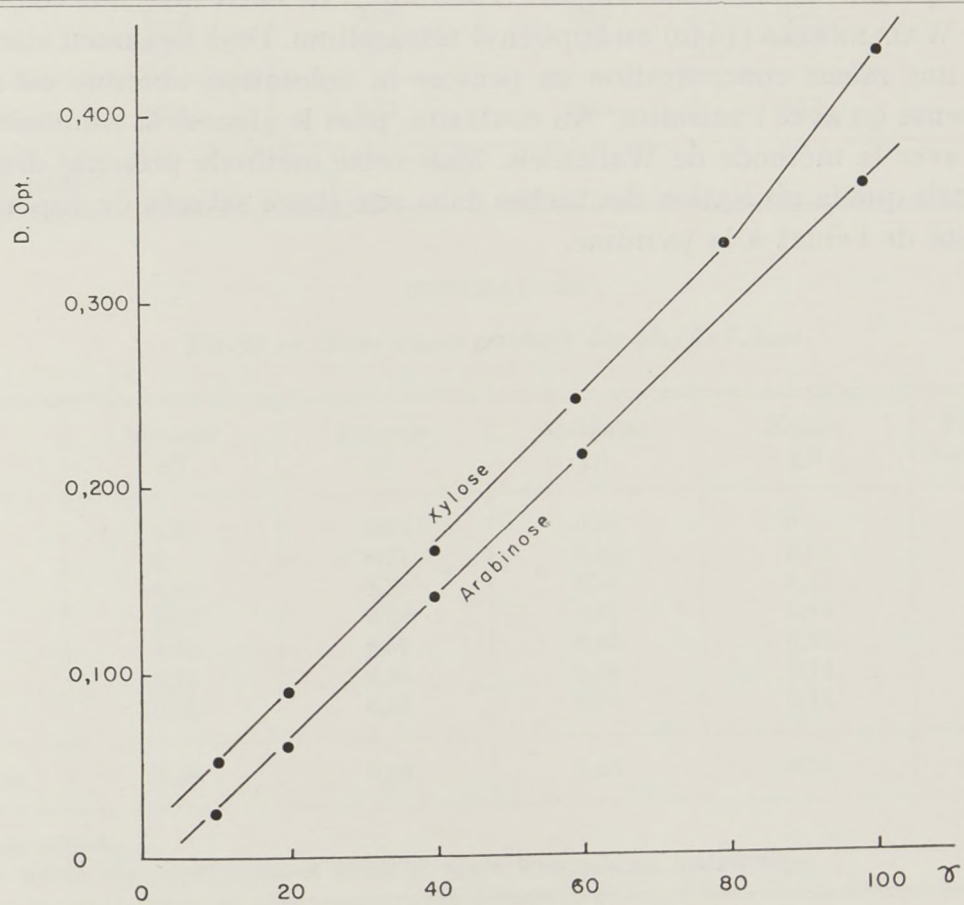
Un essai à blanc est nécessaire ainsi que l'établissement d'une courbe standard.

L'établissement de la courbe standard a été fait à partir de taches contenant 10, 20, 40, 60, 80 et 100 γ de chacun des deux pentoses. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 17 ; ils définissent les deux courbes ci-jointes.

TABLEAU 17

Établissement de la courbe standard de l'arabinose et du xylose.

Sucre en γ	Arabinose		Densité optique due à l'arabinose	Xylose		Densité optique due au xylose
10	0,130	0,127	0,025	0,153	0,160	0,052
20	0,175	0,167	0,067	0,193	0,196	0,090
40	0,242	0,244	0,139	0,270	0,268	0,165
60	0,325	0,320	0,218	0,357	0,344	0,246
80	0,395	0,400	0,293	0,435	0,435	0,331
100	0,470	0,465	0,363	0,542	0,546	0,440



Rappelons que le tableau 16 nous a montré que la reproductibilité de la métho était satisfaisante sur une même feuille. La valeur du témoin pour l'établissement cette courbe était de 0,104.

Remarque 1. — Étant donné les différences importantes de Rf du glucose et rhamnose, nous avons voulu savoir si la méthode était également applicable à deux sucres. En utilisant exactement la même technique, mais en effectuant lectures au colorimètre avec la radiation 390 mμ (correspondant au maximu d'absorption des colorations obtenues) deux séries d'expériences identiques nous o donné les chiffres du tableau 18 :

TABLEAU 18

Résultats de l'analyse colorimétrique à l'anisidine du glucose et du rhamnose.

Sucre en γ	Glucose		Rhamnose	
10	0,675	0,652	0,635	0,530
20	0,667	0,545	0,575	0,582
40	0,648	0,678	0,730	0,645
60	0,813	0,678	0,670	0,772
80	0,785	0,785	0,812	0,850
100	0,815	0,908	1,053	1,020

La densité optique du témoin était de 0,541. Le tableau montre une discordan très nette entre les deux séries. De plus les valeurs trouvées ne sont plus proportio nelles. La méthode ne peut donc pas s'appliquer au dosage du glucose et du rhamnos

Remarque 2. — Nous avons comparé la sensibilité de notre méthode colorimétriq à celle de WALLENFELS (1950) au triphényl-tétrazolium. Déjà l'examen visuel mont que pour une même concentration en pentose la coloration obtenue est netteme moins intense qu'avec l'anisidine. Au contraire, pour le glucose la coloration est pl marquée avec la méthode de Wallenfels. Mais cette méthode présente divers inco vénients tels que la révélation des taches dans une étuve saturée de vapeur d'eau la volatilité de l'éluat à la pyridine.

CHAPITRE III

ANALYSE D'UNE TRENTAINE D'ÉCHANTILLONS DE VINS DE PROVENANCES DIVERSES

Les méthodes analytiques précédemment mises au point ont été appliquées aux divers échantillons de vins dont nous avons établi les « fiches d'identité » (tableaux 5, 6, 7 et 8). Ceci nous a permis d'établir les tableaux 19, 20, 21 et 22, qui indiquent les

TABLEAU 19

Teneur en divers sucres résiduels des vins d'Alsace.

N°	Glucose g/l	Fructose g/l	Arabinose g/l	Xylose g/l	Fermentation malolactique (1)
1	0,24	0,24	0,26	0	—
2	0	0,30	0,35	0,06	—
3	0,04	0,34	0,35	0,16	—
4	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—
6	0,35	0,94	1,65	0,23	+
7	1,21	1,07	0,83	0,21	+
8	1,13	0,56	0,58	0,09	+
9	0,78	0,46	0,27	0,23	+
10	0,15	0,20	0,44	0,44	+
11	0,79	0,38	0,62	0,21	+
12	0,78	0,66	0,98	0,22	+
Moyenne	0,55	0,51	0,63	0,17	

(1) Voir tableau 5.

TABLEAU 20

Teneur en divers sucres résiduels des vins de l'Aude.

N°	Glucose g/l	Fructose g/l	Arabinose g/l	Xylose g/l	Fermentation malolactique (1)
1	1,17	0,52	0,56	0	+
2	0	0,27	1,46	0,19	+
3	0,54	0,73	0,55	0,23	+
4	0,43	0,79	0,62	0,14	+
5	0,40	0,51	0,60	0,15	—
6	0,74	0,56	0,58	0,12	+
(2)	0,25	0,48	0,50	0,14	—
Moyenne	0,50	0,55	0,69	0,14	

(1) Voir tableau 5.
(2) Le même vin respectivement avant et après fermentation malolactique.

TABLEAU 21

Teneur en divers sucres résiduels des vins de Gaillac, de Bordeaux, du Jura et du Beaujolais.

Provenance	N°	Glucose g/l	Fructose g/l	Arabinose g/l	Xylose g/l	Fermentation malolactique
Gaillac	1	—	—	—	—	—
—	2	0,09	2,12	1,27	0,25	—
—	3	0,24	1,30	1,07	0	—
—	4	—	—	—	—	+
—	5	0,13	0,19	0,78	0,21	—
Bordeaux	6	0,63	1,12	0,81	0,28	—
—	7	0,75	2,14	0,85	0,18	—
Jura	8	0,12	0,26	1,06	0,17	—
Beaujolais (2)	9	1,02	0,40	0,40	0,13	+
		0,05	0,15	0,40	0,14	—
Moyenne		0,38	0,96	0,83	0,18	

(1) Voir tableau 5.
(2) Le même vin respectivement avant et après fermentation malolactique.

TABLEAU 22

Moyenne des sucres trouvés dans les vins secs avant (+) et après (-) la fermentaiton malolactique.

	Alsace		Aude	
	+	—	+	—
Glucose	0,74	0,09	0,58	0,32
Fructose	0,77	0,29	0,57	0,49
Arabinose	0,77	0,32	0,75	0,55
Xylose	0,23	0,07	0,14	0,14
G/L	0,96	0,31	1,01	0,65

teneurs en divers sucres réducteurs pour des vins de diverses régions.

On en tire les conclusions suivantes :

1° La teneur moyenne de nos échantillons en sucre réducteur est de 2,05 g/l avec des limites de 0,71 et 3,93 g/l.

2° Le fructose se trouve dans tous les vins sans exception. Sa teneur moyenne s'élève à 0,67 g/l entre les limites de 0,15 et 2,14 g/l. Les résultats sont compris entre les valeurs extrêmes déjà trouvées par différents auteurs (voir tableau 2).

3° Le glucose a été décelé dans 92 p. 100 des échantillons. Dans 32 p. 100 d'entre eux, la teneur en glucose est même supérieure à celle du fructose. On remarquera que les derniers n'avaient pas fait leur fermentation malolactique. Le taux moyen du glucose est de 0,48 g/l et les valeurs extrêmes sonr 0 et 1,21 g/l. Les valeurs moyennes déjà données par différents auteurs varient entre 0,2 et 0,4.

4° Le rapport $\frac{\text{glucose}}{\text{fructose}}$ pour l'ensemble des échantillons est de 0,64. Il est inférieur à 1 pour les vins ayant fait leur fermentation malolactique et il est situé au voisinage de 1 pour ceux qui ne l'ont pas faite.

5° L'arabinose est présent dans tous les échantillons. Sa valeur moyenne est de 0,73 g/l avec des valeurs extrêmes de 0,26 et de 1,65 g/l. Ces résultats s'accordent dans l'ensemble avec ceux des auteurs qui ont dosé globalement les pentoses et les ont exprimés en arabinose (voir tableau 3).

6° Le xylose est présent dans 9/10 de nos échantillons. Sa teneur est parfois importante. Dans l'un des échantillons, elle est même égale à celle de l'arabinose. Nous en trouvons en moyenne 0,16 g/l, la quantité maximum étant de 0,44 g/l.

7° Le rhamnose n'a été trouvé que dans un seul vin et nous l'avons retrouvé dans ce même vin avant et après fermentation malolactique. Il s'agit d'un vin rouge de l'Aude (tableau 20, n° 6). Nous n'en avons pas fait un dosage direct, mais en comparant la grosseur de la tache à celle d'un témoin, nous estimons que sa teneur ne dépasse pas quelques dizaines de mg/l.

On peut considérer la présence de ce sucre comme exceptionnelle, bien que des auteurs, effectuant le dosage de ce méthylpentose par d'autres voies que la chromatographie sur papier, le trouvent dans tous les vins. Il semble que les méthodes employées ne soient pas spécifiques. Les quelques auteurs qui ont utilisé la chromatographie sur papier ne l'ont jamais signalé.

8° Le saccharose n'a été décelé dans aucun échantillon, ce qui confirme les données antérieures.

9° Comme l'avaient montré les analyses préliminaires des échantillons (tableau 5, 6, 7 et 8), ce sont les vins qui ont subi la fermentation malolactique qui ont la plus faible teneur en sucres résiduels. Ce résultat est particulièrement net pour les vins d'Alsace. Il l'est moins pour les vins de Gaillac, mais nous ne disposions que d'un petit nombre d'échantillons de ces derniers. Notre hypothèse d'après laquelle les ferments lactiques pourraient utiliser les sucres résiduels semble vérifiée, ceci devient d'ailleurs une certitude lorsque l'on peut doser les sucres résiduels avant et après fermentation malolactique, comme nous avons eu la chance de pouvoir le faire pour le vin de l'Aude n° 6 et pour le vin de Beaujolais n° 9. L'examen détaillé des sucres de ces deux vins montre en outre qu'après la fermentation malolactique il a disparu plus de glucose que de fructose. L'arabinose n'est que peu diminué. La teneur en xylose est pratiquement inchangée.

Reçu pour publication en mars 1961.

Ann. Technol. agric., 1962, **11**, (1) 33-43.

ESSAIS DE CARACTÉRISATION DES VINS DE RAISINS SECS

Andrée OURNAC et Michel FLANZY

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude

SOMMAIRE

Étant donné un vin, est-il possible d'établir, s'il provient ou non de la fermentation de raisins secs additionnés d'eau ?

Pour cela, on compare les vins issus de raisins frais aux vins issus des mêmes raisins après dessiccation et addition de l'eau perdue.

Les vins de raisins secs comparés aux vins de raisins frais ont sensiblement la même composition chimique, mais ils ont fermenté plus lentement, présentent une atténuation de la couleur et accusent à la dégustation des goûts particuliers et désagréables.

La chromatographie sur papier des matières colorantes a permis dans les cas étudiés de différencier les deux types de vins : dans les chromatogrammes de vins de raisins secs existe une tache fluorescente jaune vert caractéristique, de Rf : 0,50, à la place d'une tache fluorescente bleue chez les vins de raisins frais.

INTRODUCTION ET HISTORIQUE

1957 a été une année de mauvaise récolte de vin en France, au point que, au cours de 1958 le Gouvernement a décidé l'importation de vins étrangers pour satisfaire les besoins de la consommation. Certains de ces vins, en provenance de pays où l'on produit des raisins secs, ont soulevé à nouveau le problème des vins de raisins secs.

En effet, ces vins ne correspondent pas à la définition légale du vin en France qui est « le produit de la fermentation du jus de raisin frais ».

Les vins de raisins secs ont fait l'objet d'un certain nombre d'études.

PORTES et RUYSSEN en 1888 dans leur « Traité de la Vigne et de ses produits », nous exposent longuement la préparation des raisins secs et des vins correspondants. Voici leur conviction : « Si on se contente de rendre au raisin sec, et dans la proportion voulue, l'eau qui lui manque pour reconstituer le jus naturel de la vigne, on en fait un vin spécial alcoolique presque aussi normal que celui qui a été obtenu par les procédés habituels. »

« A la dose d'eau qu'on pourrait appeler naturelle, le raisin sec fournit un vin sensiblement assimilable à celui de raisin frais. »

GAUTIER A. en 1891 dans son ouvrage « Sophistication et Analyses des Vins », rapporte un certain nombre d'analyses de « piquettes de raisins secs » ; pour cet au-

teur « ces piquettes se distinguent des vins ordinaires, qui ne renferment que 1,5 g en moyenne de sucre réducteur, par leur richesse en sucre et gomme et la proportion, assez élevée, de leur extrait ».

Chauveau et Vasseur en 1929 constate « les divergences profondes parmi les auteurs consultés, certains caractères, affirmés par les uns sont contredits par les autres (telle l'acidité tartrique libre) ; d'autres sont douteux, pouvant exister ou ne pas exister (rotation levogyre, gommes). Le taux élevé de l'extrait sec, provenant du fait que les raisins secs étaient mis à fermenter directement après addition d'eau, n'a plus de raison d'être si on opère par diffusion et le sulfitage et l'emploi de levures sélectionnées empêchent les fermentations secondaires auxquelles certains auteurs attachaient une importance capitale. »

Après avoir préparé et analysé une piquette de raisins secs de Corinthe, les auteurs se résument ainsi : « Grâce à la fermentation régulière produite par les levures sélectionnées, on obtient une boisson dont les caractères chimiques ne sont pas en général différents de ceux des vins de raisins frais. »

Moredod en 1929, expert fédéral suisse, devant l'importation croissante et très forte de vins helléniques en 1927, la majeure partie de ces vins étant issus de raisins secs, a fait paraître une étude sur ces vins et a cherché de nouvelles réactions spécifiques, car, dit-il, « l'analyse chimique ordinaire n'avait pas permis jusqu'alors d'élever d'une façon sûre et certaine la critique à l'encontre de ces vins, parce qu'ils répondaient parfaitement aux prescriptions usuelles de chaque pays en matière de vin ».

Cette étude montre que la plupart des auteurs sont unanimes à penser que les caractères chimiques d'un vin ne permettent pas de distinguer un vin issu de raisin frais d'un vin issu de raisins secs.

Certains ont alors pensé aux caractères organoleptiques et physiques.

Les caractères organoleptiques

Toutes les personnes qui ont étudié le problème des vins de raisins secs ont toutes reconnu que ces vins possèdent un goût spécial, très caractéristique, qui permet de déceler d'une manière catégorique, à lui seul, leur origine.

A. Gautier disait en 1891 : « Leur goût spécial rappelle d'ailleurs le raisin séché dont ils proviennent et la dégustation reste encore l'un des meilleurs moyens de le reconnaître. »

Pour Moredod, 1929, « les vins grecs de raisins secs, les blancs et les rosés surtout, se reconnaissent assez facilement par la dégustation à leur goût tout à fait spécial, saveur à la fois âpre et doucereuse et odeur assez caractéristique, mais difficile à définir. La dégustation restera toujours un élément de premier ordre pour l'appréciation mais elle ne peut suffire à elle seule à permettre, dans tous les cas, la caractérisation des piquettes de raisins secs. »

Chauveau et Vasseur, 1929, pensent « que les experts qui peuvent avoir à se prononcer sur l'origine de certains vins se montrent trop timorés quand ils refusent de prendre en considération des caractères organoleptiques tellement accusés que les essais rappelés par nous, indiquent cent pour cent de raisins secs ». Ils considèrent aussi l'odeur du distillat de ces vins, c'est l'essai Gayon : les premières gouttes du

liquide ont une odeur caractéristique qui persiste longtemps sur les paumes des mains entre lesquelles on les a frottées.

D'après le Docteur KHOURI, 1932, « bien que l'appréciation de la saveur des piquettes et de l'odeur des premières portions du distillat (Procédé Gayon) soit assujettie à un facteur personnel, elle constitue un élément précieux de détection ».

Les caractères physiques

Les chercheurs se sont orientés vers l'emploi des rayons ultraviolets. Dès 1928 les Docteurs WERDER et ZACH ont examiné, à l'aide de la lampe à quartz (modèle HANAU), du vin de raisin sec et une série importante de vins naturels.

Le vin de raisins secs montre une luminescence intense bleu pâle, alors que les vins naturels montrent seulement une teinte verte faible ou bleuâtre, mais bien moins intensive.

Pour effectuer cet essai, les vins sont au préalable décolorés à l'aide de noir animal. Pour apprécier les quantités des deux sortes de vins dans les mélanges, les auteurs se basent sur une échelle obtenue en coupant un vin naturel avec un vin de raisins secs préparé par eux-mêmes, dans des proportions bien définies. Ils arrivent ainsi à déceler le pourcentage des coupages.

Les autres chercheurs ont repris cette propriété de fluorescence bleue aux rayons ultraviolets et l'ont confirmée.

Certains ont essayé d'élucider la nature des éléments contenus dans le vin et auxquels serait due cette fluorescence.

Pour CHAUVEAU et VASSEUR, 1931, « elle paraît due à une oxydation de la pulpe du raisin au soleil ».

D'après l'étude de KHOURI, 1932, cette fluorescence ne paraît pas être due à une substance unique mais à un complexe ; elle relève surtout d'éléments fixes du vin, le distillat n'y entre que pour une moindre part, elle semble être vraisemblablement due à des substances hydrocarbonées (lévulose, dextrine, gomme...) et à des substances résineuses.

En résumé, d'après les études parues sur la caractérisation des vins de raisins secs, on peut conclure comme CHAUVEAU et VASSEUR, 1929, « la dégustation peut rendre de très grands services dans tous les cas, l'essai du distillat (essai GAYON) ne doit jamais être omis ». « L'essai à la lumière de Wood permet ensuite de préciser assez bien la proportion de raisins secs, ou desséchés entrant dans la composition du liquide étudié. Quand les deux caractères sont présents, il ne peut y avoir aucun doute : une conclusion positive s'impose ; elle ne peut être refutée par l'argument d'une constitution qui différerait de caractères chimiques longtemps admis, devenus pour ainsi dire classiques, mais que notre analyse, très poussée, montre incertains pour les uns et, en définitive, totalement erronés pour les autres ».

« Les caractères organoleptiques et la luminescence à la lumière de Wood permettent, à notre avis, de différencier, d'une manière certaine, les piquettes de raisins secs ».

Mais on doit constater que si tous les auteurs ont comparé des vins de raisins secs à des vins de raisins frais, aucun n'a considéré les vins de raisins frais et les vins

issus des mêmes raisins séchés, auxquels on aurait rajouté l'eau nécessaire pour rétablir la composition initiale.

Il nous a semblé qu'il serait utile de combler cette lacune dans la littérature des vins de raisins secs, de façon à voir si, dans ces conditions, les deux sortes de vins présentent des différences chimiques, physiques ou organoleptiques.

TRAVAUX PERSONNELS

Voici les essais que nous avons réalisés.

PROTOCOLE DES ESSAIS

Des raisins blancs (gros vert) et rouges (muscat de Hambourg) sont desséchés par exposition aux radiations infra-rouges, sous ventilation dans un tunnel approprié. La température a varié entre 39 et 50°C.

Quand les raisins ont été jugés suffisamment secs, ils avaient perdu 70 p. 100 de leur poids initial. Ils ont été alors additionnés de la quantité d'eau perdue, ensemencés et abandonnés à la fermentation. On a reconstitué ainsi la vendage initiale. Pour nous rendre compte du degré d'homogénéité des fruits séchés, nous avons partagé chaque essai en deux lots de même poids : gros vert sec n° 1, gros vert sec n° 2, muscat de Hambourg sec n° 1 et muscat de Hambourg sce n° 2.

Parallèlement on a laissé fermenter les raisins frais correspondants. Les vins naturels et les vins de raisins secs ont été ensuite comparés entre eux.

RÉSULTATS COMPARATIFS

Fermentation

On a établi les courbes de fermentation.

Les vins de gros vert secs et les vins de gros vert frais ont la même vitesse de fermentation, au contraire, les vins de muscats ces fermentent bien moins vite que les frais.

Examen de la couleur

Les vins de raisins secs présentent une très forte atténuation de la couleur. On a déterminé les courbes d'absorption des différents vins en lumière visible et en lumière ultra-violette. Les courbes correspondantes (fig. 1 et 2) montrent bien les différences d'intensité de la coloration.

Caractères chimiques

Ils sont réunis dans le tableau 1.

TABLEAU 1

	Degré alcoolique	Sucres en g/l	Densité	Poids en g. Extrait sec	Poids en g. Cendres	méq/l alcalinité. Cendres	méq/l PO_4	Éthanal mg/l
Muscat Hambourg frais	11°72	1,78	991	21,22	2,44	32,50	9,00	6,00
Muscat Hambourg sec N° 1	10°85	2,50	991	19,13	2,51	30,75	11,25	9,68
Muscat Hambourg sec N° 2	10°50	2,40	991	19,43	2,63	31,00	12,00	10,56
Gros vert frais	9°62	1,67	995	19,36	2,17	26,75	10,50	14,96
Gros vert sec N° 1	8°75	2,16	995	20,75	2,46	26,75	14,25	13,20
Gros vert sec N° 2	8°90	2,00	994	19,32	2,27	26,50	15,00	13,55

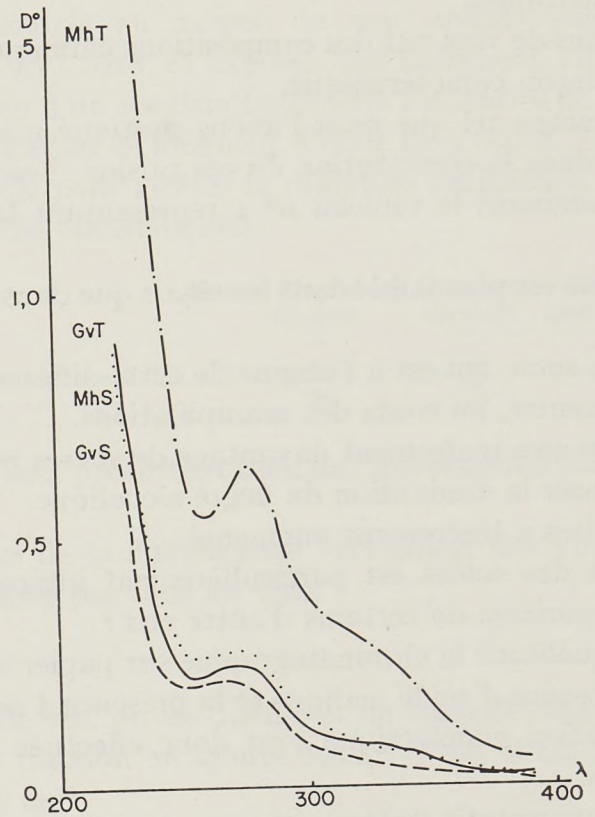


FIG 1. — *Courbes d'absorption des vins en lumière ultra-violette.*

MhT = Muscat Hambourg témoin
GvT = Gros vert témoin
MhT = Muscat Hambourg sec
MvS = Gros vert sec

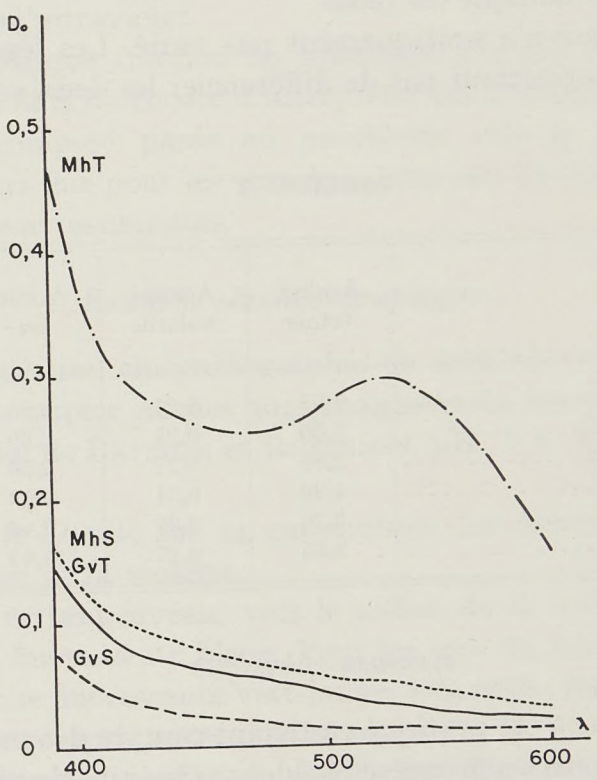


FIG 2. — *Courbes d'absorption des vins en lumière visible.*

Nous remarquerons d'abord que les deux lots de mêmes raisins secs ont donné des vins pratiquement identiques.

Les deux catégories de vins ont des compositions chimiques très voisines. Aucun élément n'a varié de façon caractéristique.

Le séchage des raisins tel que nous l'avons pratiqué n'a donc provoqué aucun changement profond dans la constitution de ces raisins. Voici les constatations que l'on peut faire en examinant le tableau n° 1 représentant la composition des vins obtenus :

Le degré alcoolique est plus faible dans les essais que dans les témoins de 7 p. 100 à 10 p. 100.

La diminution du sucre qui est à l'origine de cette différence peut être due à des pertes de jus très concentré, au cours des manipulations.

Les vins de raisins secs renferment davantage de sucres résiduaires, cela ne peut cependant pas compenser la diminution du degré alcoolique.

Le poids des cendres a légèrement augmenté.

Le comportement des acides est particulièrement intéressant. Au cours de la dessication y a-t-il disparition de certains d'entre eux ?

Au point de vue qualitatif la chromatographie sur papier ne montre pas de différence. Elle indique l'absence d'acide malique et la présence d'acide lactique dans tous les essais ; la fermentation malolactique s'est donc effectuée convenablement dans les deux sortes de vin.

Au point de vue quantitatif (tableau 2) :

— l'acidité totale a diminué ;

— l'acidité volatile est plus faible ;

— la dose d'acide lactique est moins élevée dans les vins de raisins secs, 30 à 40 p. 100 de moins. Ceci peut s'expliquer par une combustion, au cours du séchage, d'une partie de l'acide malique du raisin.

— l'acide tartrique n'a pratiquement pas varié. Les légères différences analytiques constatées ne permettent pas de différencier les deux sortes de vin.

TABLEAU 2

	Acidité totale	Acidité volatile	Acidité fixe	méq/l acide tartrique	méq/l acide lactique
Muscat Hambourg frais	3,65	0,31	2,94	40,80	19,00
Muscat Hambourg sec N° 1	3,00	0,24	2,69	46,60	12,00
Muscat Hambourg sec N° 2	2,85	0,22	2,56	44,20	12,00
Gros vert frais	4,80	0,31	4,13	67,50	18,00
Gros vert sec N° 1	3,70	0,29	3,46	65,80	10,00
Gros vert sec N° 2	3,65	0,27	3,43	62,50	9,20

Examen physique

L'examen physique a été pratiqué en tenant compte des progrès réalisés dans les méthodes d'analyse depuis les premières études sur les vins de raisins secs déjà parues. Voici comment ont été repris les essais proposés par les divers auteurs.

Essai de mesure de la fluorescence.

Les vins sont décolorés au moyen de noir animal selon la technique des Docteurs WERDER et ZACH, 1928, et exposés aux radiations ultra-violettes.

On mesure au moyen d'un spectrophotomètre l'intensité de la fluorescence émise par exposition à une radiation de longueur d'onde de 3 650 Å. Un filtre Kodak n° 48 est placé devant la cellule pour arrêter la radiation excitatrice. Voici les indications de l'appareil (en p. 100 de transmission).

	Muscat Hambourg décoloré	Gros vert décoloré	Gros vert non décoloré
Vin naturel	35	38	20
Vin raisin sec	54	53	66

Les vins de raisins secs présentent bien une fluorescence plus intense que les vins témoins.

On mesure, en plus de la fluorescence vert-jaune, des vins de raisins secs, des fluorescences bleues émises par tous les vins.

Essai Gayon (distillat).

On prend 20 cm³ de vin, on les distille et on recueille séparément des fractions, de 2,5 cm³, après la 6e fraction on ajoute 20 cm³ d'eau et on continue à recueillir 6 autres fractions de 2,5 cm³.

Ces fractions exposées à la lumière de Wood ne fluorescent pratiquement pas, ceci confirme donc le résultat déjà obtenu : les produits fluorescents que renferment les vins de raisins secs sont des produits fixes ne passant pas à la distillation.

Pour essayer de caractériser les produits volatils présentant l'odeur particulière signalée par les différents auteurs, nous avons effectué la courbe d'absorption de chaque fraction dans l'ultraviolet.

On observe pour chaque fraction un minimum à 2 400 Å et un maximum à 2 800 Å, mais il semble difficile encore d'interpréter ces courbes.

Il semble qu'un composé passe au maximum vers la 9e fraction pour les vins de raisins frais, alors que pour les vins de raisins secs les teneurs de chaque fraction seraient sensiblement constantes.

Examen chromatographique.

Nous avons effectué une chromatographie de matières colorantes : chromatographie ascendante, sur papier Arches 302, chaque tache comportait 100 μl de vin, le solvant utilisé est celui de BRITTON et ROBINSON, pH : 1,81. Technique RIBEREAU-GAYON P., 1959.

On laisse monter le liquide sur 14 cm environ. Le chromatogramme est séché puis exposé à la lumière ultra-violette.

On observe à un certain niveau, vers le milieu de la traînée, pour les vins de raisins frais, une tache fluorescente bleue. Pour les vins de raisins secs, au même niveau, se trouve une tache fluorescente vert-jaune, très nette, large de 2 cm environ. Le Rf de ces taches est compris entre 0,50 et 0,53.

La chromatographie des résidus de distillation des vins, témoin et essais, ramenés au volume primitif avec de l'eau, donne les mêmes résultats.

Au cours du séchage des raisins, il y aurait transformation d'un produit fluorescent en bleu en un produit fluorescent en vert jaune, ce produit n'étant pas volatil

Nous avons chromatographié les matières colorantes d'un certain nombre de vins blancs élaborés à la Station (Grenache blanc et rose, Clairette blanche et rose, Carignan blanc et rose, Terret, vins issus de jus désulfités, hybride blanc 12.375). Les chromatogrammes des vins de *Vitis Vinifera* présentent tous une tache fluorescente bleue de Rf voisin de 0,50, donc située au même niveau que la tache fluorescente jaune-vert des vins de raisins secs.

L'intensité de cette fluorescence bleue est différente selon les cépages, en particulier, les Grenaches blancs et roses ont une fluorescence très accentuée. Le seul hybride blanc examiné ne donne pas cette tache bleue.

A notre connaissance, aucun vin rouge de raisins frais n'a présenté de fluorescence vert-jaune dans ces conditions.

Examen organoleptique

Comme il a déjà été constaté par tous les auteurs, la dégustation des vins de raisins secs permet de les différencier. Ces vins ont tous perdu leur fraîcheur, leur naturel, leur finesse, et une partie de leur bouquet. Ils présentent, en outre, des odeurs et des goûts particuliers, désagréables, surtout d'oxydé et de cuit.

Étude de vins obtenus a partir de raisins secs de provenances diverses

On a mis en fermentation, après addition d'eau et ensemencement les raisins secs suivants :

Corinthe et Malaga (achetés dans le commerce) Muscat Alexandrie, Pirovano et Perlette (procurés par J. Cattoen et J.-P. Vidal 1958 qui ont fait une étude sur la déshydratation du raisin).

On a établi les courbes de fermentation, la composition chimique et la chromatographie des matières colorantes.

Fermentation

Ces raisins fermentent en conservant des sucres résiduaires de l'ordre de 4 g/l. Leur vitesse de fermentation est plus faible que celle correspondant à des raisins frais.

Composition chimique (Tableau 3)

TABLEAU 3

	Densité	Degré alcoolique	Sucres en g/l	Extrait sec poids en g	Cendres poids en g	Alcalinité. Cendres méq/l	PO_4 méq/l	Éthanal en mg/l
Corinthe	991	14°47	4,40	25,35	3,80	38,00	19,50	56,30
Malaga	991	13°45	3,80	22,66	3,00	35,50	16,50	11,80
Alexandrie	991	12°47	4,20	22,00	2,90	33,50	12,75	14,00

Ces vins paraissent normaux au point de vue composition chimique.

Les extraits secs demeurent dans les limites normales, d'après les chiffres rapportés par RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD, 1947 dans leur traité :

— Vins blancs de l'Hérault (ROOS) : l'extrait est compris entre 14,4 et 20,6 g.

— Vins blancs de Bourgogne (CURTEL), l'extrait varie de 16,9 à 25,4 g.

Le poids des cendres est aussi entre les limites normales qui sont, d'après les mêmes auteurs : 2,4 à 4 g. pour les vins blancs de l'Hérault.

La chromatographie sur papier des acides décèle la fin de la fermentation malolactique.

La composition quantitative de ces vins en acides se trouve dans le tableau 4, elle est très convenable. Ces vins devraient être de bonne conservation.

TABLEAU 4

	Acidité totale g/SO_4H_2/l	Acidité volatile g/SO_4H_2/l	Acidité fixe g/SO_4H_2/l	Acide tartrique en méq/l	Acide lactique en méq/l
Corinthe	3,40	0,27	3,13	33,00	4,50
Malaga	3,90	0,50	3,40	39,60	19,70
Alexandrie	4,00	0,60	3,40	41,30	18,20

Comme ils intéressent la répression des fraudes, nous leur avons appliqué les règles œnologiques permettant la recherche du mouillage et du vinage.

Voici les résultats obtenus :

A = alcool en degré.

F = Acidité fixe en g. SO_4H_2 par litre.

T = acidité totale.

E = extrait sec en g. par litre.

Régles de mouillage	Corinthe	Malaga	Alexandrie
Somme de GAUTIER A + T ..... doit être comprise entre 11,5 et 17.	17,8	17,3	16,4
Somme de BLAREZ A + F ..... D'après le degré alcoolique doit avoir comme valeur minimum.....	17,6	16,8	15,8
	—	16	15,2
Rapport de BLAREZ A/F ..... D'après le degré alcoolique doit avoir comme valeur maximum	4,6	3,9	3,7
	—	5,3	4,6
Rapport de ROOS $\frac{A + F}{A/E}$ ..... doit être supérieur à 2,4 (vins blancs).	3,3	3,1	3,1
Régle de vinage			
Rapport de vinage : $\frac{\text{poids alcool total}}{\text{extrait réduit}}$. Ce rapport varie de 3,5 à 6,5 pour les vins normaux.	5,2	5,4	5,3

Ce rapport varie de 3,5 à 6,5 pour les vins normaux.

Au cours de la chromatographie des matières colorantes tous ces vins, excepté celui provenant du raisin de Corinthe, ont présenté la tache fluorescente vert-jaune de Rf = 0,50.

CONCLUSION

Les vins de raisins secs présentent en général une composition chimique normale, l'analyse des composés courants permet de conclure à un vin naturel conforme à la définition du vin dans la législation française.

L'examen organoleptique montre des différences sensibles, les vins de raisins secs possèdent un parfum et un goût spéciaux et désagréables.

Les vins obtenus par addition intégrale au fruit sec de l'eau évaporée, présentent, par rapport au vin de raisins frais, de très faibles différences dans la constitution chimique et une forte atténuation de la couleur.

Les premières gouttes du distillat d'un vin de raisins secs développent une mauvaise odeur persistante et caractéristique.

Les vins de raisins secs après décoloration au charbon animal ont une fluorescence particulière.

La différence la plus nette et la moins sujette à interprétation, que nous avons constatée entre les deux sortes de vins, est leur comportement au cours de la chromatographie sur papier des matières colorantes.

Le chromatogramme des vins de raisins secs présente une tache fluorescente très nette qui ne se retrouve pas dans le cas des vins de raisins frais.

Il semble que la chromatographie puisse fournir un élément sûr de caractérisation des vins de raisins secs, élément ne faisant pas intervenir de facteur personnel comme, par exemple, la dégustation.

Ce résultat demande tout de même à être confirmé dans un plus grand nombre de cas.

Reçu pour publication en septembre 1961.

SUMMARY

TRIALS OF IDENTIFICATION OF RAISIN WINES

Is it possible to determine wether a wine has been made or not from raisin added with water?

The wines from grapes are compared with the wines from the same grapes after drying and addition of the lost water.

The raisin wines compared with the grape wines have approximately the same chemical composition, but they have fermented more slowly, are less coloured and have a specific and disagreeable taste.

The paper chromatography of the coloured substances has allowed to differentiate the two types of wines : the chromatograms of raisin wines show a characteristic fluorescent yellow green spot of Rf : 0,50, instead of a fluorescent blue spot for the grape wines.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CATTOEN J. et VIDAL J. P., 1958. Essais de déshydratation du Raisin. *Bull. tech.* Edité par la Chambre d'Agriculture et la Société de recherches et d'expérimentations agricoles des P. O., 133.

CHAUVEAU L., VASSEUR A., 1929. Contribution à l'étude des piquettes de raisins secs. *Ann. Fals. Fraudes*, **22**, 340.

CHAUVEAU L., VASSEUR A., 1931. Les piquettes de raisins secs. *Ann. Fals. Fraudes*, **24**, 341.

GAUTIER A., 1891. Sophistication et analyse des vins. Paris, Librairie J. B. Baillère et Fils, 176-182.

KHOURI J., 1932. Sur la distinction des piquettes de raisins secs des vins naturels courants de raisins frais. *Ann. Fals. Fraudes*, **25**, 583.
KLING A., 1948. Méthodes actuelles d'expertise employées au laboratoire municipal de Paris, éd. Dunod, **3**, 154.
MOREDOD R., 1929. Etude sur le vin de raisins secs. *Ann. Fals. Fraudes*, **22**, 524.
PORTES L., RUYSSEN F., 1888. Traité de la vigne et de ses produits, éd. Octave Doin, Pa,ris, **2**,345-372.
RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1947. Analyse et contrôle des Vins. Librairie Polytechnique C. H Béranger, Paris et Liège.
RIBEREAU-GAYON P., 1959. Recherches sur les anthocyanes des végétaux. Application au genre *Vitis*. Thèse, Librairie générale de l'Enseignement, Paris, 96.
WERDER J., ZACH C., 1928. Travaux Chimie Alimentaire et d'Hygiène, Suisse, 19, n° 1, d'après *Ann. Fals. Fraudes*, **21**, 158.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (1), 45-53.

LES ACÉTOBACTER DU CIDRE : IDENTIFICATION DE QUELQUES SOUCHES

J. MAUGENET

Station de Technologie végétale, Versailles (Seine et Oise).

SOMMAIRE

Les *Acetobacter* peuvent provoquer dans le cidre des altérations par production d'acide acétique et d'éthanal. En employant un milieu non sélectif à base de cidre, 40 souches ont été isolées de 90 échantillons de cidre de différentes origines. D'après la classification de FRATEUR les espèces suivantes ont été identifiées : *A. xylinum*, *A. aceti*, *A. mesoxydans*, *A. ascendens* et *A. rancens*. L'espèce la plus fréquente est *A. rancens* qui représente 70 p. 100 des souches examinées.

On a trouvé que dans la même espèce il y a plusieurs possibilités d'oxydation de l'acide acétique. Quelques souches ne peuvent l'oxyder qu'en milieu acide, d'autres seulement en milieu neutre, mais beaucoup ne demandent pas de conditions spéciales. Cette particularité explique la difficulté rencontrée dans des travaux antérieurs pour obtenir l'oxydation de l'acide acétique avec toutes les souches classées comme *A. rancens*.

La production d'acétylméthylcarbinol à partir de l'acide lactique est fréquente parmi les souches de *A. rancens*. Cette caractéristique présente un intérêt spécial en cidrerie car l'acétylméthylcarbinol a été trouvé dans les produits altérés.

Aucune relation n'a été trouvée entre ces deux propriétés importantes.

I. — INTRODUCTION

Rôle des acetobacter dans le cidre

L'acétification est connue depuis longtemps dans le cidre sous le nom de maladie de la piqûre ou acescence. Les bactéries acétiques oxydent l'alcool éthylique en acide acétique et elles développent une odeur déplaisante de vinaigre (acétate d'éthyle) et un goût acide qui rend le cidre impropre à la consommation. Les bactéries acétiques sont parfois visibles sous la forme d'un voile le plus souvent gris blanc velouté, qui peut devenir par la suite ridé, résistant et glaireux.

Cette altération, autrefois fréquemment rencontrée dans les fabrications de cidre sec, ne persiste généralement plus que dans les fabrications artisanales ou familiales. La modernisation du matériel et des méthodes a permis d'éliminer la plupart des causes d'aération du cidre. Le mode de stockage au froid et l'emploi de l'anydride sulfureux en cours de fabrication ont aussi largement contribué à la régression de cette maladie.

En dehors de l'acétification on a reconnu depuis quelques années le rôle d bactéries acétiques dans la maladie du framboisé. Celle-ci se manifeste par un troub plus ou moins laiteux, colloïdal, persistant et réapparaissant même après filtratio par un goût âcre et un arôme fruité, et en fin de maladie (plusieurs mois) par un disparition partielle de ces caractères et presque toujours une légère acétificatio Du point de vue chimique on constate l'accumulation d'acétaldéhyde dans le cidr soit à l'état libre, soit en combinaison colloïdale avec les tanins.

L'origine de cet aldéhyde n'est pas connue d'une façon certaine, il est d'ailleur possible qu'il soit produit par des réactions différentes. Pour certains auteurs, e en particulier WARCOLLIER (1928), l'accumulation d'acétaldéhyde apparaît comm une déviation de l'acétification lorsque l'oxygène est en trop faible quantité pou oxyder l'éthanol jusqu'au stade acide acétique. D'autres expérimentateurs GUI TONNEAU, MOCQUOT et TAVERNIER (1940) puis TAVERNIER (1960) ont montré qu les bactéries acétiques, lorsqu'elles sont génées par la présence d'une fermentatio alcoolique, produisent de l'éthanal par oxydation limitée de l'éthanol. Plus récem ment BIDAN et MAUGENET (1960) ont trouvé de l'acétaldéhyde comme produit d métabolisme de l'acide lactique dans le cidre par *Acetobacter*. Certaines espèces et en particulier *A. rancens* sont en effet capables de dégrader l'acide lactique en acétal déhyde et de synthétiser l'acétylméthylcarbinol.

Cette dernière altération se rencontre encore assez fréquemment malgré le progrès importants réalisés dans l'industrie du cidre.

Espèces déjà rencontrées dans le cidre

Peu de travaux ont été effectués sur les bactéries acétiques dans le cidre. CARR (1958) divise les bactéries acétiques du cidre, d'après les travaux de LEIFSON (1954) et de SHIMWELL (1958), en deux genres : *Acetomonas* et *Acetobacter*. Le genre *Aceto bacter* se caractérise par des flagelles péritriches quand ils sont mobiles et par leur capacité d'oxyder l'alcool éthylique d'abord en acide acétique puis en gaz carbonique et eau. Le genre *Acetomonas* se distingue du précédent par son incapacité d'oxyder l'alcool éthylique plus loin que l'acide acétique et par un flagelle polaire lorsque les souches sont mobiles.

Des représentants des deux genres ont été isolés par CARR. Deux espèces appartiennent au genre *Acetomonas* (*A. suboxydans* et *A. melanogenum*), elles sont présentes au début de la fermentation et persistent jusqu'au dernier stade. Par contre le genre *Acetobacter*, représenté dans le jus de pomme par *Acetobacter mesoxydans* disparaît durant la phase d'intense activité des levures et réapparaît accompagné d'*Acetobacter xylinum* et *Acetobacter rancens* lorsque la fermentation alcoolique est terminée. Ces deux dernières espèces pourraient très bien (SHIMWELL, 1956) être simplement des mutants de *A. mesoxydans* apparus pendant l'élaboration du cidre.

De plus il ressort de ces travaux que les organismes aérobies peuvent non seulement subsister durant la fermentation alcoolique mais encore se multiplier. Il serait intéressant de savoir comment ces bactéries peuvent survivre et quelle est la nature de leur métabolisme durant la période où l'oxygène est absent.

II. — TRAVAUX PERSONNELS : IDENTIFICATION DES SOUCHES ISOLÉES DANS LE CIDRE

Origine des souches

Nous n'avons pas cherché, comme dans les travaux de Carr à suivre l'évolution de la population acétique pendant la transformation d'un lot de pommes, mais plutôt à caractériser les diverses espèces de bactéries acétiques que l'on pouvait trouver dans un très large échantillonnage de cidres français.

La collection a été composée de souches isolées à partir d'échantillons de cidre de diverses provenances régionales, à divers stades fermentatifs (depuis le jus de pomme jusqu'au cidre sec en passant par le cidre doux) ; certaines souches proviennent également de cidres en fermentation malo-lactique ou en début de maladie du framboisé.

Beaucoup de ces souches paraissant être les mêmes, nous avons limité à 50 le nombre des souches de notre collection destinées aux tests de caractérisation.

Milieu et méthode d'isolement

Le cidre doux représente un milieu de choix pour le développement des souches de bactéries acétiques. Pour la commodité des isolements nous avons recherché un milieu où les bactéries pourraient retrouver la plupart des facteurs de croissance et sensiblement le même pH que dans leur milieu d'origine. Après de nombreux essais, un milieu à base de cidre a été mis au point au laboratoire, contenant :

Cidre doux	500 ml
Eau désionisée	500 ml
Yeast Extract Difco	1,2 g
Phosphate tri-ammonique	2 g

on ajuste à pH 5 et le milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Pour le milieu gélosé nous employons l'agar-agar à raison de 20 g par litre.

Ce milieu n'est pas sélectif mais il convient très bien pour les *Acetobacter* tant pour leur isolement que pour leur conservation en collection.

Pour l'isolement et la purification nous procédons par alternance de culture sur tube de milieu liquide et sur milieu gélosé en boîtes de Petri, ces cultures étant incubées à l'étuve à 30°C.

La première opération est une numération d'une dilution appropriée de cidre ; ensuite un examen microscopique des divers types de colonies permet de trier les souches se rapprochant morphologiquement des *Acetobacter*. Celles-ci subissent généralement deux purifications et au stade final sont conservées en strie sur tube de milieu gélosé incliné.

La méthode de coloration de Gram et ensuite le test de production d'acide acétique sur le milieu éthanol-craie-gélose permettent d'éliminer la plupart des souches autres qu'*Acetobacter* (*Pseudomonas* et *Aerobacter* par exemple que l'on rencontre souvent dans le cidre).

Sur 91 échantillons examinés par cette méthode, 40 ont fourni des isolements d'*Acetobacter*. Dans les autres échantillons, la flore prédominante étant constituée par d'autres espèces, principalement des *Pseudomonas*, il n'a pas été possible d'isoler des *Acetobacter*.

Les souches sont conservées à la chambre froide, soit sur milieu gélosé incliné avec repiquage tous les 2 ou 3 mois, soit sur milieu gélosé incliné mais sous huile de vaseline avec repiquage tous les douze mois. Avant d'être réutilisées les souches subissent toujours un contrôle de pureté.

Identification d'après la classification de Frateur

Quoique de récents travaux soient orientés vers une nouvelle classification des *Acetobacter* en deux genres : *Acetomonas* et *Acetobacter*, la classification de Frateur (1950) constitue encore un excellent moyen de travail pour l'identification des souches. C'est à celle-ci que nous nous sommes référés pour identifier nos souches et sur 50, 47 entrèrent dans le cadre de cette classification et 3 ne furent pas identifiées.

Les diverses espèces caractérisées se trouvent réunies dans le tableau I et il est à remarquer que nous n'avons trouvé que des représentants des groupes *Oxydans* et *Mesoxydans* proposés par FRATEUR.

Nous n'avons pas éprouvé de difficultés particulières dans l'interprétation des tests. L'ensemencement, pour ceux-ci, a été fait à partir de culture en strie de 3 jours à 30°C sur milieu eau de levure gélosée 2 p. 100 — glucose 10 p. 100 — CO_3Ca 3 p. 100 ; dans le cas de souches poussant difficilement sur glucose (par exemple *A. ascendens*) la culture a été effectuée sur milieu eau de levure gélosée 2 p. 100 — lactate de calcium 2 p. 100.

TABLEAU I

Identification des souches

Groupe	Espèces	%	N° des souches
MESOXYDANS	*A. xylinum*	2	544
	A. xylinum var. xylinoïdes	4	582 – 501
	A. aceti	6	013 – 352 – 331
	A. mesoxydans var. saccharovorans	4	411 – 471
	A. mesoxydans	4	161 – 162
OXYDANS	*A. ascendens*	4	901 – 055
	A. rancens var. saccharovorans	20	523 – 545 – 554 – 571 – 731 – 291 – 042 – 741 – 081 – 531
	A. rancens	50	171 – 911 – 041 – 045 – 131 – 481 – 044 – 271 – 551 – 521 – 533 – 541 – 542 – 532 – 553 – 591 – 461 – 711 – 552 – 043 – 511 – 512 – 181 – 251 – 431
Souches non identifiées		6	241 – 401 – 931

Dans nos isolements c'est l'espèce *A. rancens* qui constitue la population dominante (70 p. 100). Il est à remarquer que *A. aceti* apparaît dans nos isolements (6 p. 100) alors qu'il n'a pas été jusqu'ici isolé dans le vin (DUPUY, 1957). Une mention particulière peut être faite pour *A. mesoxydans* var. *saccharovorans* (4 p. 100), qui a aussi été nommé *Bacterium dihydroxyacetonicum* VIRTANEN et BÄRLAND pour sa particularité de produire de la dihydroxyacétone à partir du glycérol ; ce n'est pas le seul *Acetobacter* qui possède cette propriété mais à cause du rendement important qu'il fournit, il peut être utilisé pour la production industrielle de la dihydroxyacétone. Des essais de laboratoire nous ont d'ailleurs permis de vérifier cette propriété des souches n° 411 et 471.

Après cette identification dans le cadre de la classification de FRATEUR nous avons cependant recherché quelles différences pouvaient être mises en évidence parmi nos diverses souches d'un même groupe en considérant deux métabolismes importants chez les *Acetobacter* : d'abord le métabolisme de l'alcool et de l'acide acétique, ensuite le métabolisme du glucose avec production d'acides ou de composés cétoniques.

Nous avons en particulier appliqué ce test au groupe des *A. rancens* qui constitue la majorité de nos isolements.

Métabolisme de l'alcool et de l'acide acétique

Ce test est généralement effectué en faisant une culture en strie sur eau de levure gélosée 2 p. 100, alcool éthylique 3 p. 100 et CO_3 Ca 2 p. 100. L'oxydation de l'alcool se remarque par la dissolution et la transformation de CO_3Ca en acétate de calcium. L'oxydation de l'acétate ou suroxydation se traduit par une nouvelle précipitation de CO_3Ca. Celle-ci peut se faire soit sous forme d'irisation à la surface de la gélose, soit sous forme de cristaux plus gros et sphéroïdaux, cette dernière forme étant d'ailleurs celle que nous avons le plus fréquemment rencontrée.

Une autre méthode indiquée par FRATEUR consiste à ensemencer un milieu eau de levure + alcool 2 p. 100 et à suivre par titrage avec la soude 0,1 N les variations de l'acidité totale. Cette méthode peut donner des résultats différents de la précédente car la suroxydation parfois ne se manifeste pas.

D'après les travaux de FEDERICO et ANTONIANI, l'addition à un milieu de l'un des acides du cycle de KREBS augmente la vitesse de suroxydation de l'acide acétique. Selon la technique employée par DUPUY (1957) nous avons ajouté au milieu indiqué par FRATEUR 0,2 p. 100 de succinate de Na.

On arrive ainsi à produire la suroxydation de l'acide acétique alors que le test sans succinate n'avait pas permis de la déceler. Les résultats de ces deux techniques se trouvent consignés dans le tableau 2.

TABLEAU 2

*Oxydation de l'acétate par 2 souches d'*A. rancens *selon les tests utilisés*

Temps	Souche n° 291				Souche n° 511			
	Test en milieu gélosé		Test en milieu liquide		Test en milieu gélosé		Test en milieu liquide	
	d'après FRATEUR	d'après SHIMWELL	sans succinate *	avec succinate *	d'après FRATEUR	d'après SHIMWELL	sans succinate *	avec succinate *
jours								
1		oxyd. +	11	6		oxyd. +	16	6
2			224	136			272	123
4			266	85			287	123
6			272	69			287	23
7		suroxyd. +				suroxyd. +		
8			275				293	
9	oxyd. +			0	oxyd. +			10
14			290				300	3
15	suroxyd. +				suroxyd. +			
18			298				311	
22			303				311	

* Chiffres exprimant l'acidité totale en micro-équivalents par ml de culture.

SHIMWELL (1960) utilise une nouvelle méthode qui consiste à réaliser une culture en strie sur un milieu contenant :

	%
Yeast Extract Difco	1
Ethanol	1,5
Agar-agar	2,5

A celui-ci est ajouté du vert de bromocresol comme indicateur de pH, et, en quantité suffisante pour donner au milieu une teinte bleue.

Le test est simple : le milieu devient jaune lorsqu'il y a production d'acide acétique à partir de l'éthanol et plus tard redevient bleu si l'acide acétique est lui-même oxydé en CO_2 et H_2O.

Nous avons appliqué celui-ci à nos souches et dans bien des cas il nous a permis de vérifier leur aptitude à la suroxydation : exemple des souches 291 et 511, soumises aux quatre techniques réunies dans le tableau 2.

Dans une communication personnelle SHIMWELL nous a suggéré que les résultats discordants obtenus par les divers tests d'oxydation de l'acétate pourraient provenir du fait que certaines souches sont incapables de faire cette oxydation en milieu neutre. Ceci est assez vraisemblable car dans ces conditions l'acétate est entièrement ionisé.

Les souches déjà classées comme *A. rancens* ont été testées pour le caractère « oxydation de l'acide acétique » avec deux méthodes différentes :

— la méthode préconisée par SHIMWELL où l'oxydation se fait en milieu acide ;

— la méthode des oxydogrammes sur lactate de calcium dans laquelle l'oxydation du lactate et de l'acétate s'effectue en milieu neutre et produit un dépôt de carbonate de calcium.

TABLEAU 3

Oxydation de l'acétate par les souches classées comme A. rancens

Souches oxydant l'acétate	N° des souches	%
uniquement en milieu neutre	131 – 481 – 044 – 271	12
uniquement en milieu acide	461 – 511 – 512 – 532 – 552 – 591 – 711 – 042 – 291 – 545 – 553 – 554 – 741	37
en milieu acide et en milieu neutre	081 – 521 – 531 – 731 – 533 – 571 – 171 – 181 – 431 – 041 – 911 – 045 – 523 – 551 – 043 – 542 – 541 – 251	51

Les résultats sont consignés dans le tableau 3, ils montrent que certaines souches sont indifférentes au pH mais qu'une proportion importante des souches (37 p. 100) n'oxyde l'acide acétique que lorsqu'elles sont placées en milieu acide. Il faut aussi remarquer qu'une faible proportion des souches n'oxyde l'acétate qu'en milieu neutre.

Ces méthodes ont également été appliquées aux diverses souches d'*Acetobacter* que nous avions isolées (tableau 4) et des résultats analogues ont été obtenus.

Pouvoir cétogène.

Comme l'ont indiqué FRATEUR, SIMONART et COULON (1954) il est possible en utilisant la chromatographie sur papier d'étudier les produits du métabolisme du glucose. Après séparation le papier est révélé par l'oxalate acide d'aniline et permet

d'identifier le 5- et le 2-cétogluconate. Cette méthode permet de déceler le pouvoir cétogène des diverses souches du groupe *Oxydans* et d'identifier les substances réductrices produites, ce qui n'est pas le cas avec la technique des oxydogrammes. Le point le plus intéressant est la production d'acide 2-cétogluconique à partir du glucose par *A. rancens*.

TABLEAU 4

*Oxydation de l'acétate et production de l'acétylméthylcarbinol (AMC) par les diverses souches d'*Acetobacter

Souches oxydant l'acétate	Nombre de souches		
uniquement en milieu neutre	5	AMC sur lactate +	1
		AMC sur lactate —	4
uniquement en milieu acide	20	AMC sur lactate +	8
		AMC sur lactate —	12
en milieu acide et en milieu neutre	24	AMC sur lactate +	9
		AMC sur lactate —	15

Cette méthode chromatographique nous a rendu beaucoup de services en nous permettant de constater que de nombreuses souches de *A. rancens* pouvaient produire de l'acide 2-cétogluconique aux dépens du glucose. Ces souches d'ailleurs se caractérisaient sur milieu Yeast Extract 0,6 p. 100, glucose 10 p. 100, CO_3Ca 3 p. 100, agar-agar 2 p. 100 par la formation d'une forte irisation orangée au bout de 20 jours de culture à 30°. Le pouvoir cétogène par la méthode sur oxydogramme, s'il était parfois visible par la production de lévulose à partir de mannitol, était rarement évident sur glycérol, ce qui peut s'expliquer par le fait que ces souches n'accumulent pas de dihydroxyacétone parce qu'elles l'oxydent au fur et à mesure de sa formation.

III. — DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS

Si nous nous référons aux travaux de Carr (1958) nous pouvons constater la différence qui existe dans les espèces d'*Acetobacter* trouvées au cours de nos deux études. Le but de nos isolements n'était d'ailleurs pas le même car nous n'avons pas cherché à suivre l'évolution de la population d'*Acetobacter* dans un échantillon donné mais nous avons voulu isoler des *Acetobacter* à partir d'échantillons très nombreux pour savoir quelles pouvaient être les diverses espèces rencontrées dans ce milieu.

N'étant pas partis de la pomme ou de jus sorti de presse, il est peut-être normal que nous n'ayons trouvé aucun membre du groupe *Suboxydans* mais seulement des groupes *Mesoxydans* et *Oxydans*.

Acetobacter rancens représente 70 p. 100 de nos isolements mais à l'intérieur même de l'espèce nous avons pu distinguer plusieurs types en précisant le métabolisme de l'alcool et de l'acide acétique selon le test préconisé par Shimwell et en considérant le métabolisme du glucose eu égard au pouvoir cétogène.

L'examen plus détaillé de l'espèce *A. rancens* nous a permis de constater que beaucoup de souches présentaient un caractère cétogène, pouvoir cétogène que nous avons pu mettre en évidence en examinant par chromatographie les produits du métabolisme du glucose. Les souches capables de produire de l'acide 2-cétogluconique à partir du glucose se distinguent aussi par leur forte production d'acétylméthylcarbinol sur lactate de calcium (méthode des oxydogrammes).

La possibilité de synthétiser de l'acétylméthylcarbinol est un caractère particulièrement intéressant pour l'industrie du cidre. On sait en effet que ce composé a été rencontré par GUITTONNEAU, BEJAMBES et TAVERNIER (1941) dans des cidres altérés. Sa formation a été attribuée aux *Aerobacter* et à la condensation de l'éthanal par la levure.

La présence dans de nombreux échantillons d'*Acetobacter* susceptibles de produire de l'acétylméthylcarbinol par métabolisme de l'acide lactique, nous amène à nous demander s'il n'y aurait pas là une autre source de ce composé. DE LEY a étudié récemment (1959) les voies de formation de l'acétylméthylcarbinol par les bactéries acétiques à partir du pyruvate. Les deux voies font intervenir comme coenzyme la thiamine pyrophosphate (cocarboxylase).

$$CH_3CHO - \text{Cocarboxylase} + CH_3CHO \rightarrow CH_3COCHOHCH_3$$
$$CH_3CHO - \text{Cocarboxylase} + CH_3\,COCOOH \rightarrow CH_3COCHOHCH_3 + CO_2$$

Les souches de *A. rancens* et *A. ascendens* appartenant au groupe *Oxydans* et qui forment la plus grande partie des souches que nous avons isolées du cidre, sont aussi celles qui forment le plus d'acétylméthylcarbinol.

Nous avons vérifié par quelques essais faits dans le micromanomètre de WARBURG que plusieurs des souches que nous avons isolées étaient capables de métaboliser en aérobiose l'acide lactique en produisant de l'acétylméthylcarbinol.

IV — CONCLUSION

Des isolements de bactéries acétiques dans des échantillons de cidres normaux, ont montré la présence de ces germes dans 45 p. 100 des cas. Ceci montre les possibilités d'altérations d'un grand nombre de cidres, augmentées par la circulation de ces liquides d'une cuve à l'autre.

Il y a donc intérêt à mettre en œuvre outre les précautions de propreté habituelles, des techniques empêchant le développement des *Acetobacter*, en particulier l'absence d'aération pendant la conservation et l'utilisation rationnelle de l'acide sulfureux.

Reçu pour publication en décembre 1961.

SUMMARY

THE ACETOBACTER IN CIDER. IDENTIFICATION OF SOME STRAINS

Acetobacter can cause spoilage in cider by producing acetic acid and ethanal. Using a non selective medium containing cider, 40 strains were isolated from 91 samples of ciders from different origines. According to the Frateur's classification, the following species were identified : *A. xylinum*, *A. aceti*, *A. mesoxydans*, *A. ascendens* and *A. rancens*. The most frequent species is *A. rancens*, 70 p. 100 of the examinated strains.

It was found that in the same species, there are different abilities to oxidize acetic acid. Some strains can do that only in acidic medium, others only in neutral medium but many have no special requirement. This peculiarity explains the difficulty encountered in previous works to obtain the oxidation of acetic acid with all the strains classified as *A. rancens*.

The capacity of producing acetylmethylcarbinol from lactic acid is frequent among the strains of *A. rancens*. This characteristic is of special interest in cider making because acetylmethylcarbinol was also found in spoiled products.

No correlation can be found between these two important properties.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIDAN P., MAUGENET J., 1960. Contribution à l'étude de l'altération des cidres appelée « Framboisé ». *C. R. Acad. Agri.*, **6**, 358.

CARR J. G., 1958. Acetic acid bacteria in ciders. *Ann. Rep. Long Ashton Res. Sta.*, 160.

CARR J. G., 1958. The fate of acetic acid bacteria in fermenting cider. *Proc. Symposium Fruit Juice Concentrates*, Bristol. Juris — Verlag, Zürich, 383-390.

DUPUY P., 1957. Les Acetobacter du vin. Identification de quelques souches. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 217.

FRATEUR J., 1950. Essai sur la systématique des Acetobacter. *La cellule*, **53**, 287.

FRATEUR J., SIMONART P., COULON T., 1954. Étude chromatographique de cultures d'Acetobacter. *Antonie van Leeuwenhoek*, **20**, 111.

GUITTONNEAU G., MOCQUOT G., TAVERNIER J., 1940. La cause microbiologique de la maladie des cidres dits framboisés. *Ann. Technol. agric.*, **3**, 34.

GUITTONNEAU G., BEJAMBES M., TAVERNIER J., 1941. Sur la présence et l'origine de l'acétylméthylcarbinol et du butanediol 2-3 dans les cidres normands. Les Aerobacter en cidrerie. *Ann. Ferment.*, **6**, 159.

LEIFSON E., 1954. The flagellation and taxonomy of species of Acetobacter. *Antonie van Leeuwenhoek*, **20**, 102.

DE LEY J., 1959. On the formation of acetoin by Acetobacter. *J. Gen. Microbiol.*, **21**, 352.

SHIMWELL J. L., 1956. Transmutation of species in the genus Acetobacter. *J. Inst. Brew.*, **62**, 339.

SHIMWELL J. L., 1958. Flagellation and Taxonomy of Acetobacter and Acetomonas. *Antonie van Leeuwenhoek*, **24**, 187.

SHIMWELL J. L., 1960. Communication personnelle.

TAVERNIER J., 1960. Sur quelques maladies microbiennes des cidres : casse verte, maladie du framboisé, maladie de l'acroléine. *Rev. Ferm. Ind. alim.*, **15**, 103.

WARCOLLIER G., 1928. Cidrerie. *Librairie Baillière et Fils*, Paris.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (1), 55-62.

VALEUR NUTRITIVE DES PROTÉINES DU LAIT STÉRILISÉ CONSERVÉ DANS DIVERSES CONDITIONS DE TEMPÉRATURE ET D'EXPOSITION A LA LUMIÈRE

Denise HUGOT et J. CAUSERET

Laboratoire d'Etudes sur la Nutrition,
Centre national de Recherches Zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise).

SOMMAIRE

Les auteurs ont déterminé, chez le jeune Rat, la valeur nutritive des protéines du lait stérilisé conservé dans des bouteilles de verre blanc, pendant 6, 10, ou 26 semaines :
— au réfrigérateur (+ 4°C) dans l'obscurité ;
— à 20°C, dans l'obscurité ;
— à 20°C, avec exposition à la lumière solaire diffuse ;
— à 38°C, dans l'obscurité ;
— à 38°C, avec exposition à la lumière solaire directe et éclairement artificiel continu.
Aucune diminution notable du coefficient d'utilisation digestive des protéines ou de leur valeur biologique n'a été observée, bien que les laits exposés à la lumière aient présenté un fort brunissement dès la fin de la deuxième semaine de conservation.

I. — INTRODUCTION

Il semble que la valeur nutritive des protéines du lait soit peu modifiée par les méthodes en usage actuellement pour la stérilisation du lait.

Sans doute Cook et al. (1951) ont-ils observé, dans certains cas, une légère diminution de l'efficacité protidique pour le Rat, consécutive à la stérilisation de lait évaporé ; cette diminution pourrait s'expliquer par une perte d'acides aminés essentiels, lysine et histidine notamment (Hodson et Krueger, 1946). Mais Whitnah (1943) assigne le même coefficient d'utilisation digestive et la même valeur biologique, pour le Rat, à divers échantillons de lait frais et de lait évaporé stérilisé préparé au laboratoire ou provenant du commerce. Schroeder et al. (1953), travaillant sur le Chien, obtiennent des résultats identiques avec le lait frais, le lait chauffé à plus de 120° pendant 30 minutes et des laits évaporés du commerce. Hodson (1952) qui utilise chez le Rat une méthode de recouvrement du poids après déplétion, observe des reprises de poids égales avec le lait évaporé, avant et après stérilisation.

Cependant, les laits stérilisés ou évaporés stérilisés ne sont généralement pas consommés de manière immédiate. Il importe donc de savoir si la durée et les conditions de stokage modifient la valeur nutritive de leurs protéines.

Les seuls travaux que nous ayons relevés sur cette question concernent le lait évaporé stérilisé, qui conserverait toute sa valeur pendant 1 an au moins lorsqu'il est maintenu à la température de la pièce (WHITNAH, 1943 ; COOK et al, 1951 ; HODSON, 1952). Il faudrait des conditions extrêmes pour obtenir une détérioration : après 1 an à 38°C, HODSON (1952), a observé des pertes de divers acides aminés essentiels voisines de 10 p. 100 et, après 2 ans à 38°C, des pertes voisines de 30 p. 100 pour la lysine, l'histidine et l'arginine. Mais les produits correspondants étaient devenus inconsommables.

Nous ne connaissons pas de travaux similaires portant sur le lait stérilisé en bouteilles. Cette lacune est d'autant plus regrettable que le lait en bouteilles peut subir non seulement des températures élevées, mais aussi l'action de la lumière, qui favorise le brunissement du produit, vraisemblablement du type réaction de Maillard.

Parallèlement à un autre travail sur l'évolution de la valeur vitaminique du lait stérilisé en bouteilles au cours d'un stockage de longue durée (CAUSERET et al., 1961), nous avons donc effectué une série d'études sur la valeur nutritive des protéines du même lait, conservé dans diverses conditions de température et d'exposition à la lumière.

II. — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

1°. CARACTÉRISTIQUES DU LAIT ET CONDITIONS DE CONSERVATION

Les caractéristiques du lait utilisé et les conditions de conservation des bouteilles ont été décrites dans notre première publication (CAUSERET et al., 1961).

Rappelons simplement que les bouteilles, qui provenaient d'un même lot, ont été conservées dans des conditions diverses :

— au réfrigérateur (+ 4°C), dans l'obscurité ;
— à + 20°C ± 2°, dans l'obscurité ;
— à 20°C ± 2°, avec exposition à une lumière diffuse (local exposé au nord) ;
— à + 38°C ± 0°5, dans l'obscurité ;
— à + 38°C ± 0°5, dans des conditions d'éclairement extrêmes : exposition à la lumière solaire directe, avec éclairement artificiel continu.

Une partie des bouteilles de chaque groupe a été prélevée au « temps zéro », puis à la fin de la 6e, de la 10e et de la 26e semaines, pour préparer les régimes destinés aux animaux.

En outre, à chaque série d'essais, un lait pasteurisé, standardisé à 3 p. 100 de matière grasse, a été utilisé comme lait témoin.

2° CONDUITE DES BILANS AZOTÉS

Les bilans ont porté au total sur 150 rats mâles, pesant initialement de 70 à 95 g.

Ces rats ont été répartis en lots de 7 à 9 sujets qui ont été soumis successivement :

— à un régime protéiprive, pour détermination de l'azote endogène (8 jours, avec bilan azoté à partir du 3e jour) ;

— à un régime à 10 p. 100 de peptone pancréatique et par ailleurs complet, jusqu'au recouvrement du poids initial (7 jours) ;

— à un régime à 10 p. 100 de protéines de lait (11 jours, avec bilan azoté à partir du 4e jour), dont la composition p. 100 g de matière sèche est la suivante :

Lait stérilisé (ou pasteurisé)	300 ml
Saccharose	29 g
Amidon	35 g
Mélange salin spécial (1)	0,075 g

(1) Mélange salin de HUBBEL, MENDEL et WAKEMAN, réduit aux sources d'oligoéléments.

III. — RÉSULTATS

Les résultats des bilans sont groupés dans les tableaux 1 à 4.

On voit que les valeurs moyennes du coefficient d'utilisation digestive et de la valeur biologique sont groupées dans des intervalles étroits : à aucun stade de la conservation, la différence entre la valeur la plus élevée et la plus faible ne dépasse 6 p. 100 dans le cas du C. U. D. et 14 p. 100 dans le cas de la V. B. (1).

TABLEAU 1

Résultats expérimentaux, « temps zéro ».

Laits	Rats	N ingéré		N fécal		N urinaire		C.U.D.	V.B.
		Période sans protéines	Période avec protéines	Période sans protéines	Période avec protéines	Période sans protéines	Période avec protéines		
		mg	mg	mg	mg	mg	mg		
L. pasteurisé	1	2,9	184,2	9,1	23,7	31,4	51,4	92,0	88,0
	2	3,0	195,8	7,5	25,8	33,0	64,7	90,5	81,9
	3	2,1	172,6	6,5	24,1	33,0	49,9	89,7	88,9
	4	2,2	155,0	7,6	24,7	31,8	53,5	88,8	84,0
	5	2,6	183,7	7,6	22,7	30,4	49,6	91,6	88,4
	6	2,5	152,8	6,4	19,7	28,9	37,3	91,2	93,9
	7	2,7	163,7	8,0	25,2	23,5	42,5	89,3	86,8
	8	2,6	148,4	7,6	19,7	30,0	44,6	91,7	89,0
	9	2,5	157,1	8,8	24,0	30,5	51,8	90,2	84,7
	Moyennes							*90,5*	*87,3*
L. stérilisé	10	2,7	169,7	10,0	22,2	33,7	68,8	92,7	77,4
	11	2,9	220,2	8,4	22,0	34,0	68,4	93,7	83,1
	12	2,4	194,6	8,8	18,9	34,0	67,2	94,8	81,7
	13	2,3	189,9	9,6	20,4	29,1	58,5	94,2	83,3
	14	2,3	183,3	7,8	24,1	30,7	52,1	91,0	87,0
	15	2,6	130,5	6,7	15,1	28,7	41,8	93,4	89,0
	16	2,1	124,4	6,7	15,9	30,7	42,0	92,5	90,1
	17	2,9	159,1	8,2	15,2	26,3	43,7	95,5	88,3
	18	2,6	142,8	7,5	18,7	26,4	56,2	92,0	76,8
	Moyennes							*93,3*	*84,1*

Le calcul du (*t*) de Student montre que la plupart des différences observées ne sont pas significatives. Toutefois :

— après 6 semaines, la valeur biologique du lait conservé à 38° C et à la lumière est légèrement inférieure à celle des autres échantillons (la différence entre cette valeur et celle du lait pasteurisé est significative au seuil de P = .01 ; — entre cette même valeur et celle du lait stérilisé stocké au réfrigérateur, au seuil de P = .05) ;

— après 10 semaines, la valeur biologique de tous les échantillons de lait stérilisé est légèrement inférieure à celle du lait pasteurisé (au seuil de P = . 05 ou P = . 01 suivant les cas) ;

(1) La consommation de nourriture des animaux qui reçoivent du lait stérilisé est inférieure à celle des sujets qui reçoivent du lait pasteurisé : dans le cas des laits soumis de manière prolongée à l'action de la lumière, la diminution de la consommation est de l'ordre de un quart à un tiers. Nous avons montré qu'une telle diminution n'affecte pas l'utilisation digestive et la valeur biologique des protéines (Randoin et Causeret, 1956).

TABLEAU 2

Résultats expérimentaux, après 6 semaines de conservation.

Laits	Rats	N ingéré		N fécal		N urinaire		C.U.D.	V.B.
		Période sans protéines	Période avec protéines	Période sans protéines	Période avec protéines	Période sans protéines	Période avec protéines		
		mg	mg	mg	mg	mg	mg		
L. pasteurisé	1	2,8	185,8	7,5	18,0	26,9	42,4	94,2	91,0
	2	2,3	186,2	6,6	23,5	24,8	36,7	90,8	92,8
	3	2,9	221,2	8,6	16,5	25,0	42,8	96,3	91,5
	4	2,2	201,0	6,3	22,4	28,4	44,9	91,9	90,9
	5	2,5	211,0	7,7	19,4	25,4	51,4	94,4	86,7
	6	2,8	199,8	6,5	19,2	16,9	48,7	93,5	82,7
	Moyennes							*93,5*	*89,3*
L. stérilisé « réfrigérateur »	7	2,8	158,7	8,9	18,0	25,2	46,5	94,2	85,5
	8	2,5	144,5	8,2	21,9	27,5	37,9	90,4	91,9
	9	2,9	163,1	6,9	20,8	30,0	48,6	91,3	87,3
	10	2,8	171,0	8,7	14,4	29,3	49,6	96,6	87,5
	11	2,6	152,6	6,4	18,3	28,3	43,1	92,0	89,3
	12	3,4	170,1	10,3	24,7	24,3	54,8	91,4	80,0
	13	2,6	166,7	7,8	22,5	19,6	46,2	91,0	82,2
	Moyennes							*92,4*	*86,2*
L. stérilisé 20°C « Obscurité »	14	3,0	148,3	9,3	20,6	30,3	46,0	92,1	88,3
	15	2,8	168,5	8,9	26,3	27,6	45,8	89,5	87,7
	16	2,7	127,8	7,8	18,2	19,6	41,0	91,7	81,3
	17	2,4	144,8	7,2	16,5	24,5	40,5	93,4	88,0
	18	2,6	176,3	8,3	14,2	20,2	43,3	96,6	86,2
	19	2,8	168,0	7,5	27,5	25,2	42,6	87,9	88,0
	20	2,2	153,3	7,0	19,5	15,9	47,4	91,7	77,2
	Moyennes							*91,8*	*85,2*
L. stérilisé 20°C « Lumière »	21	2,5	137,8	7,9	19,0	23,9	35,4	91,8	90,7
	22	2,8	124,1	8,2	13,3	22,9	41,0	95,8	84,4
	23	2,6	127,5	8,2	18,4	25,3	42,1	91,8	85,4
	24	2,3	121,2	7,8	13,9	24,9	34,7	94,8	91,3
	25	2,9	147,0	8,5	21,6	25,9	42,1	90,9	87,6
	26	2,7	128,2	7,5	14,6	16,6	37,3	94,3	82,5
	27	2,5	117,4	7,4	14,0	16,1	32,0	94,4	85,6
	Moyennes							*93,8*	*86,8*
L. stérilisé 38°C « Obscurité »	28	2,7	140,9	7,1	22,4	24,1	41,4	88,9	86,0
	29	2,1	151,4	6,5	20,1	25,2	43,9	90,9	86,2
	30	2,6	150,9	13,9	19,7	33,4	48,0	96,0	89,7
	31	2,9	150,8	7,4	18,0	25,8	40,4	92,8	89,3
	32	2,4	132,7	8,2	24,3	27,6	35,6	87,6	92,8
	33	3,0	146,6	9,4	23,6	24,1	50,8	90,0	78,5
	34	2,9	151,0	9,4	23,5	20,7	45,2	90,5	81,7
	Moyennes							*90,9*	*86,3*
L. stérilisé 38°C « Lumière »	35	2,4	101,4	6,7	14,6	26,6	41,2	92,0	84,0
	36	2,7	113,6	8,5	13,0	30,4	42,6	95,9	88,5
	37	2,6	132,1	10,3	12,4	21,3	42,4	98,4	83,4
	38	2,5	106,2	8,4	12,8	26,7	49,9	95,7	76,6
	39	2,3	128,8	6,4	16,9	20,6	59,1	91,7	66,8
	40	2,5	120,7	7,5	13,5	12,8	41,8	94,9	74,2
	41	2,5	120,4	7,3	13,9	13,4	35,9	94,3	79,8
	42	2,9	114,4	9,9	10,4	13,5	35,0	99,5	80,6
	Moyennes							*95,3*	*79,2*

TABLEAU 3

Résultats expérimentaux, après 10 semaines de conservation

Laits	Rats	N ingéré		N fécal		N urinaire		C.U.D.	V.B.
		Période sans protéines	Période avec protéines	Période sans protéines	Période avec protéines	Période sans protéines	Période avec protéines		
		mg	mg	mg	mg	mg	mg		
L. pasteurisé	1	3,0	147,8	8,3	21,0	23,3	38,3	91,2	88,6
	2	2,4	153,6	6,1	15,8	25,3	40,4	93,5	89,3
	3	3,2	161,9	7,2	20,7	25,8	31,6	91,5	96,0
	4	2,6	156,7	6,6	14,6	23,7	33,4	94,8	93,3
	5	2,9	148,6	7,2	14,1	26,7	33,2	95,2	95,3
	6	2,7	151,5	6,9	17,0	19,7	48,3	93,2	79,4
	7	3,2	160,1	8,1	15,9	21,3	41,7	95,0	86,3
	Moyennes							*93,5*	*89,7*
L. stérilisé « réfrigérateur »	8	2,9	139,8	7,0	18,1	29,3	41,5	91,8	90,3
	9	3,1	137,8	12,9	15,6	24,9	50,7	98,0	80,5
	10	3,5	120,5	8,3	13,3	26,6	41,3	95,7	86,9
	11	3,0	129,9	8,3	14,5	21,8	40,1	95,1	84,9
	12	3,1	141,4	8,8	21,7	23,7	49,2	90,6	79,7
	13	2,0	136,8	4,5	17,4	26,4	57,6	90,4	74,4
	14	3,8	135,8	8,3	14,4	21,3	50,8	95,4	76,5
	Moyennes							*93,8*	*81,9*
L. stérilisé 20°C « Obscurité »	15	2,1	114,2	7,3	16,8	26,8	49,1	91,5	78,2
	16	3,1	131,3	5,6	13,9	24,4	50,4	93,5	78,3
	17	2,4	135,8	7,1	13,2	28,3	43,7	95,5	87,9
	18	2,3	128,9	6,9	13,4	18,6	48,2	94,9	75,4
	19	2,7	129,9	8,2	15,6	11,9	40,3	94,2	76,3
	20	3,1	135,2	8,6	11,6	21,7	46,5	97,8	80,9
	21	3,6	139,1	7,8	16,2	17,2	56,7	93,8	68,9
	Moyennes							*94,4*	*78,0*
L. stérilisé 20°C « Lumière »	22	3,1	118,6	6,7	12,5	25,0	48,8	95,0	78,2
	23	2,9	102,1	7,6	14,3	26,5	50,3	93,2	74,2
	24	2,9	121,4	6,9	9,8	23,0	49,0	97,6	77,5
	25	2,7	116,8	5,9	11,6	26,1	40,2	95,0	86,9
	26	2,7	123,3	6,8	13,6	26,5	48,8	94,3	80,3
	27	2,7	119,5	7,1	12,1	29,1	48,2	95,7	82,9
	28	2,7	123,8	8,0	23,4	15,2	45,5	95,5	73,8
	29	2,6	110,4	5,7	14,7	23,0	52,3	91,7	70,4
	Moyennes							*94,7*	*78,0*
L. stérilisé 38°C « Obscurité »	30	2,4	118,4	5,6	12,2	26,5	45,0	94,4	83,1
	31	2,6	121,0	6,8	15,5	22,3	41,8	92,6	82,3
	32	3,1	125,7	7,2	16,1	21,6	45,7	92,7	78,8
	31	2,6	117,9	8,0	8,3	23,1	49,1	99,7	77,4
	34	3,1	134,6	7,7	17,2	19,7	55,8	92,7	70,4
	35	2,6	127,2	7,4	18,1	8,6	45,0	91,4	68,0
	36	3,5	116,5	9,1	13,9	31,4	44,3	95,7	88,1
	Moyennes							*94,2*	*78,3*
L. stérilisé 38°C « Lumière »	37	2,8	120,1	6,6	17,0	25,7	46,9	91,1	80,1
	38	2,8	106,0	7,3	10,6	21,3	42,8	96,7	78,5
	39	3,3	118,6	8,9	16,6	21,8	45,5	93,3	78,0
	40	2,7	119,4	7,8	16,5	27,6	48,3	92,6	80,8
	41	2,5	126,2	6,5	12,8	26,6	52,1	94,9	78,3
	42	2,4	117,1	6,7	16,0	28,2	43,0	91,9	85,9
	43	3,1	116,8	7,1	13,5	22,3	53,9	94,3	70,5
	44	3,0	118,3	6,7	10,9	10,1	37,6	96,4	75,3
	Moyennes							*93,9*	*78,4*

TABLEAU 4

Résultats expérimentaux, après 26 semaines de conservation

Laits	Rats	N ingéré		N fécal		N urinaire		C.U.D.	V.B.
		Période sans protéines	Période avec protéines	Période sans protéines	Période avec protéines	Période sans protéines	Période avec protéines		
		mg	mg	mg	mg	mg	mg		
L. pasteurisé	1	2,2	178,2	8,7	23,6	32,4	46,7	91,5	91,1
	2	3,2	162,2	9,0	21,3	23,5	45,2	92,3	85,2
	3	2,8	186,5	8,0	20,3	31,0	67,3	93,3	78,8
	4	2,4	157,4	6,7	19,5	29,6	52,1	91,7	84,2
	5	3,1	182,5	7,1	20,4	25,7	58,5	92,6	87,7
	6	3,7	187,3	10,7	21,4	23,6	72,9	94,2	87,6
	7	2,4	159,7	5,4	18,2	17,5	48,4	91,9	78,6
	Moyennes							*92,5*	*84,7*
L. stérilisé « réfrigérateur »	8	3,0	119,4	8,1	14,4	22,6	51,1	94,6	74,0
	9	2,5	131,6	9,4	20,6	29,8	38,5	91,3	92,6
	10	2,8	157,4	8,4	17,6	23,1	58,9	94,0	75,4
	11	2,1	156,7	7,0	17,1	36,6	49,5	93,4	91,0
	12	2,2	134,7	6,3	12,4	19,6	43,4	95,4	81,2
	13	2,4	153,8	8,4	20,6	15,3	55,4	91,9	71,2
	14	3,2	152,8	8,2	16,1	18,1	49,6	94,7	77,8
	Moyennes							*93,6*	*80,4*
L. stérilisé 20°C « Obscurité »	15	2,8	135,2	7,2	16,3	28,2	50,8	93,2	81,7
	16	3,0	152,6	7,9	15,5	31,8	67,7	94,9	74,7
	17	2,6	162,0	8,4	25,0	37,3	53,2	89,5	88,9
	18	2,5	165,9	7,2	25,0	21,9	60,9	89,1	73,3
	19	2,8	153,9	6,8	17,3	24,0	51,7	93,0	80,3
	20	2,8	119,4	7,9	19,7	20,9	40,9	89,9	80,9
	21	2,6	117,6	6,7	22,5	20,1	35,1	86,3	84,9
	Moyennes							*90,8*	*80,7*
L. stérilisé 20°C « Lumière »	22	2,6	135,8	7,3	18,8	33,5	57,9	91,4	79,9
	23	2,2	102,7	8,4	12,7	28,2	54,3	95,2	72,9
	24	2,4	108,1	6,0	11,7	25,1	54,2	94,6	70,9
	25	2,4	92,5	6,6	10,4	16,9	43,1	95,8	69,7
	26	3,2	141,7	6,5	14,8	20,2	51,1	94,0	76,3
	27	3,1	118,4	10,5	18,1	24,9	53,2	93,4	73,8
	28	2,9	107,0	10,0	19,0	18,5	35,9	88,9	81,7
	29	3,2	119,0	8,3	19,5	16,5	45,5	90,3	72,2
	Moyennes							*93,0*	*74,7*
L. stérilisé 38°C « Obscurité »	30	2,4	143,3	6,3	26,1	28,9	54,2	85,9	79,0
	31	2,3	127,6	10,4	28,2	32,7	47,8	85,7	85,9
	32	2,4	145,5	7,8	24,4	29,0	42,8	88,4	89,0
	33	2,4	144,5	7,3	24,3	31,8	42,0	88,0	91,8
	34	2,6	137,0	8,3	15,0	24,4	51,0	95,0	79,2
	35	2,2	132,4	5,6	19,2	23,5	41,4	89,6	84,6
	36	2,8	145,7	8,8	23,1	20,6	57,0	90,0	71,7
	Moyennes							*88,9*	*83,0*
L. stérilisé 38°C « Lumière »	37	2,2	114,9	7,9	24,0	32,4	49,9	85,7	81,9
	38	2,4	112,1	9,0	23,1	35,1	59,7	87,2	74,2
	39	2,3	117,7	6,7	27,5	39,4	50,4	81,9	88,4
	40	2,7	119,5	4,7	27,0	28,0	54,9	80,9	71,6
	41	2,7	100,1	7,9	19,9	27,9	48,7	87,6	75,7
	42	2,8	113,5	9,2	18,5	28,5	45,7	91,5	83,0
	43	2,7	94,3	5,7	7,3	25,1	52,9	98,2	69,0
	44	2,5	117,9	6,0	16,9	12,4	34,8	90,5	78,5
	Moyennes							*87,9*	*77,8*

— après 26 semaines, la valeur biologique des deux échantillons de lait stérilisé conservés à la lumière, est légèrement inférieure à celle du lait pasteurisé (au seuil de P = .01 dans le cas de l'échantillon maintenu à 20°C et de P = . 05 dans celui de l'échantillon maintenu à 38°C).

Ces constatations n'ont qu'un intérêt limité. Outre qu'elles concernent des différences relativement faibles, il se peut qu'elles résultent pour une part, non pas d'une évolution de la valeur nutritive des protéines de certains échantillons de lait stérilisé au cours de la conservation, mais du fait que les divers laits pasteurisés n'avaient pas la même origine que le lait stérilisé et présentaient vraisemblablement entre eux de légères différences de valeur nutritive.

D'autre part, toute comparaison entre les valeurs biologiques d'un même lait après diverses durées de stockage serait aléatoire, les essais correspondants n'ayant pas porté sur les mêmes animaux. Ce type de comparaison n'aurait d'intérêt que si l'on observait des variations importantes du C. U. D. ou de la V. B. au cours du temps, ce qui n'est pas le cas.

Dans les conditions de l'expérience, on peut considérer en définitive que l'utilisation digestive et la valeur biologique des protéines du lait stérilisé n'ont pas présenté de détérioration importante, même après une longue conservation dans des conditions de température et d'exposition à la lumière particulièrement sévères. Cette constatation est d'autant plus remarquable que les laits exposés à la lumière présentaient dès la fin de la deuxième semaine un fort brunissement, accompagné du développement d'une saveur désagréable.

Reçu pour publication en septembre 1961.

SUMMARY

NUTRITIVE VALUE OF THE PROTEINS FROM STERILIZED MILK PRESERVED UNDER VARIOUS CONDITIONS OF TEMPERATURE AND LIGHT EXPOSITION

The authors have determined in the young rat the nutritive value of the proteins of sterilized milk preserved in white glass flasks during 6,10 or 26 weeks.

— in a freezer (+ 4° C) at /darkness ;
— at + 20° C at darkness ;
— at + 20° C exposed to diffused sunlight ;
— at + 38° C at darkness ;
— at + 38° C exposed to direct sunlight and continued artificial light.

No significant reduction of the digestive utilisation coefficient of the proteins or of their biological value has been noticed, although milk exposed to light turned a pronounced brown towards the second week of preservation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Causeret J., Hugot D., Goulas-Scholler C., Mocquot G., 1961. Évolution de la teneur du lait stérilisé en riboflavine et en vitamine A au cours d'une conservation de longue durée. *Ann. Technol. Agric.*, **10**, 289.

Cook B. B., Morgan A. F., Weast E. O., Parker J., 1951. The effect of heat treatment on the nutritive value of milk proteins. I. Evaporated and powdered milks. *J. Nutr.*, **44**, 51.

Hodson A. Z., Krueger G. M., 1946. Essential amino acid content of casein and fresh and processed cow's milk as determined microbiologically on hydrolyzates. *Arch. Biochem.*, **10**, 55.

Hodson A. Z., 1952. Nutritive value of milk proteins. I. Stability during sterilization and storage of evaporated milk as determined by the rat repletion method. *Food Res.*, **17**, 168.

LELU P., 1934. L'utilisation digestive comparée des matières albuminoïdes chez diverses espèces animales. *Arch. Int. Physiol.*, **39**, 34.
MARTIN C., ROBISON J., 1922. Minimum N expenditure of man and the biological value of various proteins for human nutrition. *Biochem. Journ.*, **16**, 407.
RANDOIN L., CAUSERET J., 1956. Recherches préliminaires sur l'utilisation digestive et sur la valeur biologique des protides de diverses espèces de fromages. *Ann. Technol. Agric.*, **5**, 541.
SCHROEDER L. J., IACOBELLIS M., SMITH A. H., 1953. Heat processing and the nutritive value of milk and milk products. *J. Nutr.*, **49**, 549.
WHITNAH C. H., 1943. Nutritive value of milk proteins. *Food Res.*, **8**, 89.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (1), 63-67.

ÉVOLUTION DE LA TENEUR DU LAIT STÉRILISÉ EN THIAMINE ET EN PYRIDOXINE AU COURS D'UNE CONSERVATION DE LONGUE DURÉE

M. LHUISSIER et Évelyne BIETTE

Laboratoire d'Études sur la Nutrition,
Centre national de Recherches Zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)

SOMMAIRE

Les auteurs ont étudié l'évolution, au cours d'une conservation de 6 mois, de la teneur en thiamine et en pyridoxine du lait stérilisé, en bouteilles de verre blanc, conservées :

— à l'obscurité, à + 4°C ;
— à l'obscurité, à + 20°C ;
— à la lumière solaire diffuse, à + 20°C ;
— à l'obscurité, à + 39°C ;
— à la lumière solaire directe et celle de tubes fluorescents, à + 39°C.

1° La thiamine est stable si le lait est maintenu au réfrigérateur, ou dans l'obscurité à + 20°C ; à + 39°C et dans l'obscurité, de légères pertes se produisent (25 p. 100 après 6 mois de conservation).

L'exposition du lait à la lumière provoque des pertes plus élevées : après 6 mois de séjour à la lumière diffuse (à + 20°C) ou à la lumière directe (à + 39°C), ces pertes atteignent respectivement 25 p. 100 et 70 p. 100.

2° La pyridoxine est stable si le lait est maintenu au réfrigérateur ; à + 20°C et à + 39°C, dans l'obscurité, de légères pertes se produisent (respectivement 20 p. 100 et 30 p. 100 après 6 mois de conservation).

L'exposition du lait à la lumière accroît fortement les pertes : après 2 semaines de séjour à la lumière diffuse (à + 20°C) ou à la lumière directe (à + 39°C), les pertes atteignent déjà 25 p. 100 et 50 p. 100. Après 6 mois, les pertes sont totales.

3° Ces constatations confirment qu'il est essentiel, pour assurer le maintien de la valeur vitaminique du lait stérilisé, de conserver celui-ci à l'abri de la lumière, même diffuse. Elles montrent aussi qu'il est préférable, pour prévenir toute perte de thiamine ou de pyridoxine, d'éviter des températures trop élevées.

INTRODUCTION

Ce travail fait suite à une étude sur l'évolution de la teneur du lait stérilisé en riboflavine et en vitamine A au cours d'une conservation de longue durée (Causeret et *al.*, 1961).

L'influence de la température de conservation sur la thiamine du lait stérilisé a été mise en évidence par Mijll Dekker et Engel (1952) : le lait stérilisé maintenu à + 39°C et dans l'obscurité perd, en 6 mois, 25 p. 100 de sa thiamine alors que la

perte, à la température de la pièce, est de 15 p. 100. D'autre part, l'exposition à la lumière, à la température de la pièce, n'entraînerait pas de pertes supplémentaires.

L'action destructrice de la lumière sur la pyridoxine dans le lait est établie (DEBRIT, 1952 ; HELLSTRÖM, 1954, 1959, 1960). Ainsi HELLSTRÖM (1960) a observé des pertes de 15 à 46 p. 100 après 2 heures d'exposition, à la lumière solaire directe, de lait pasteurisé en carafes de verre blanc. Mais les essais réalisés ont porté sur du lait exposé à la lumière pendant quelques heures tout au plus. Ils ne fournissent donc aucune information sur le comportement de la pyridoxine dans le lait stérilisé exposé à la lumière pendant une durée prolongée. Quant à l'action de la température de conservation sur la pyridoxine du lait liquide, il ne semble pas qu'elle ait fait l'objet d'études systématiques.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Les caractéristiques du lait utilisé, ainsi que les conditions de prélèvement et de conservation ont été les mêmes que dans le travail précédent (CAUSERET et *al.*, 1961).

Nous nous bornerons donc à rappeler que des lots de 7 à 10 bouteilles en verre blanc de lait stérilisé ont été prélevés au « temps zéro » (10 avril 1961), puis après 2, 6, 10, 14 et 26 semaines de conservation dans les conditions suivantes :

— à l'obscurité, à + 4°C (réfrigérateur) ;
— à l'obscurité, à + 20°C ;
— à la lumière solaire diffuse, à + 20°C ;
— à l'obscurité, à + 39°C ;
— à la lumière solaire directe et à celle de tubes fluorescents, à + 39°C.

Les dosages sont effectués par voie microbiologique. La thiamine est extraite et dosée selon la méthode de SARRET et CHELDELIN (1944), modifiée par CHELDELIN et *al.*, (1946) ; de plus le milieu de base est préparé à partir de « Bacto Thiamine Assay Medium » de Difco. La pyridoxine est extraite et dosée par la méthode d'ATKIN et *al.*, (1943) légèrement modifiée : le milieu, additionné d'acide nicotinique (0,5 mg pour 100 ml de milieu double) est distribué dans des fioles d'Erlenmeyer non agitées.

RÉSULTATS

Le lait stérilisé contient initialement, pour 100 g :

33 µg de thiamine,

23 µg de pyridoxine, exprimée en pyridoxol.

Ces taux sont inférieurs respectivement de 20 et 19 p. 100 à ceux du lait prélevé avant la préstérilisation.

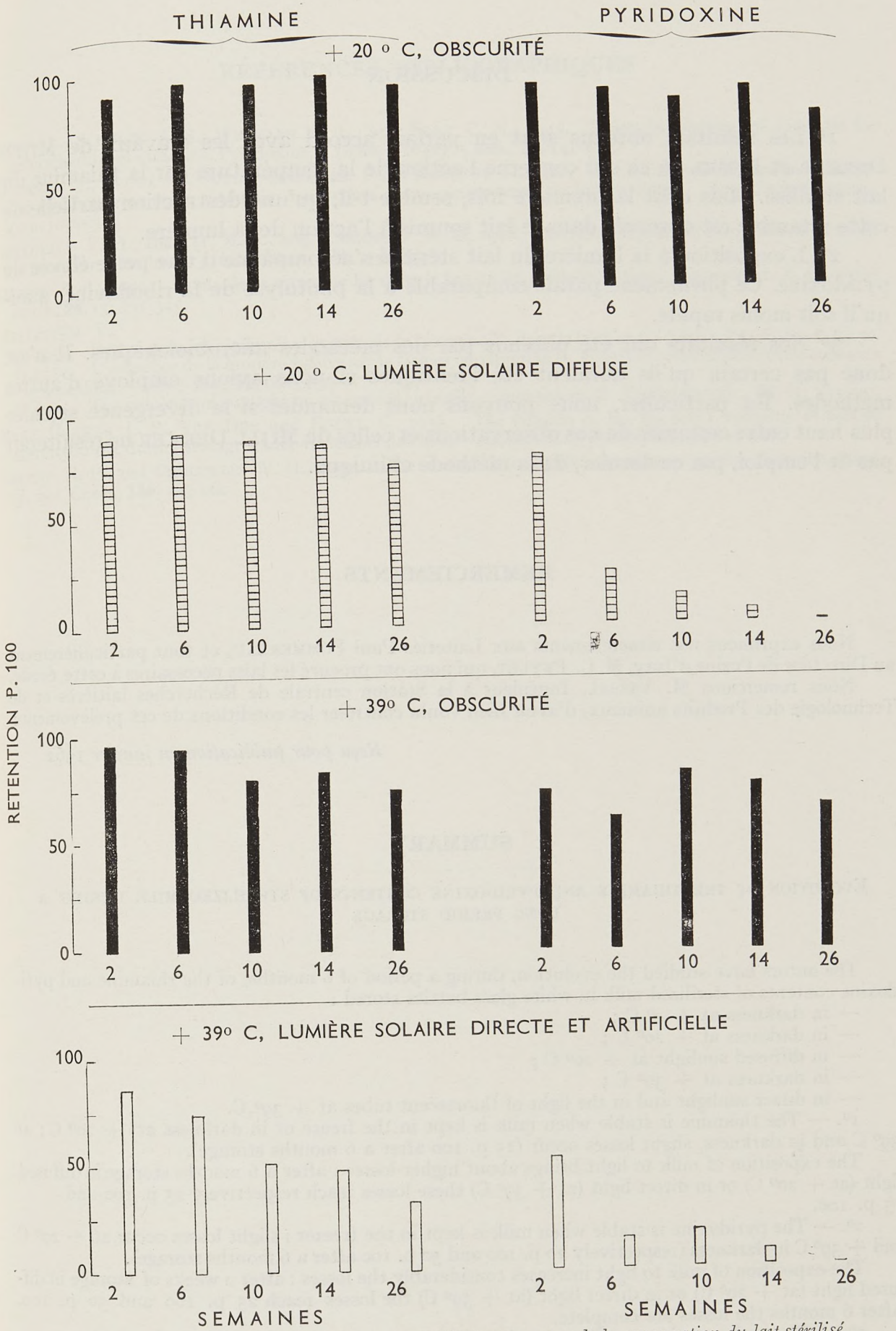
Les résultats sont indiqués dans le graphique 1.

1° La thiamine est stable, si le lait est maintenu à l'obscurité et si la température n'est pas trop élevée : après 6 mois de séjour à + 20°C on retrouve pratiquement la teneur initiale. Mais, à + 39°C et dans l'obscurité, le taux s'abaisse lentement et la perte atteint 25 p. 100 après 6 mois de conservation.

Le séjour à la lumière diffuse (à + 20°C) ou à la lumière directe (à + 39°C) augmente les pertes (25 p. 100 et 70 p. 100 après 6 mois).

2° La pyridoxine est stable si le lait est maintenu dans l'obscurité, au réfrigérateur. A + 20°C et à + 39°C, dans l'obscurité, les pertes sont de 20 et 30 p. 100 après 6 mois.

Le séjour à la lumière diffuse (à + 20°C) ou à la lumière directe (à + 39°C) entraîne une perte rapide (25 et 50 p. 100 après 2 semaines) ; la teneur devient nulle après 6 mois.



GRAPHIQUE 1. — *Taux de thiamine et de pyridoxine au cours de la conservation du lait stérilisé.*

L'évolution des teneurs en thiamine et en pyridoxine du lait conservé au réfrigérateur ne figurent pas sur le graphique : celles-ci sont restées stables pendant les 26 semaines de l'expérience.

DISCUSSION

1° Les résultats obtenus sont en parfait accord avec les travaux de MIJLL DEKKER et ENGEL en ce qui concerne l'action de la température sur la thiamine du lait stérilisé. Mais c'est la première fois, semble-t-il, qu'une destruction partielle de cette vitamine est observée dans le lait soumis à l'action de la lumière.

2° L'exposition à la lumière du lait stérilisé s'accompagne d'une perte élevée de pyridoxine. Ce phénomène paraît comparable à la photolyse de la riboflavine, quoiqu'il soit moins rapide.

3° Nos résultats ont été obtenus par des méthodes microbiologiques. Il n'est donc pas certain qu'ils auraient été identiques si nous avions employé d'autres méthodes. En particulier, nous pouvons nous demander si la divergence signalée plus haut entre certaines de nos observations et celles de MIJLL DEKKER ne résulterait pas de l'emploi, par ce dernier, de la méthode chimique.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons nos remerciements aux Laiteries Paul POMMEREAU, et tout particulièrement au Directeur de l'usine d'Ivry, M. C. PEYLET, qui nous ont procuré les laits nécessaires à cette étude.

Nous remercions M. VASSAL, Ingénieur à la Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux, d'avoir bien voulu contrôler les conditions de ces prélèvements

Reçu pour publication en janvier 1962

SUMMARY

EVOLUTION OF THE THIAMINE AND PYRIDOXINE CONTENTS OF STERILIZED MILK DURING A LONG PERIOD STORAGE

The autors have studied the evolution, during a period of 6 months, of the thiamine and pyridoxine contents of sterilized milk in white glass bottles stored :

— in darkness at + 4° C ;
— in darkness at + 20° C ;
— in diffused sunlight at + 20° C ;
— in darkness at + 39° C ;
— in direct sunlight and in the light of fluorescent tubes at + 39° C.

1°. — The thiamine is stable when milk is kept in the freeze or in darkness at + 20° C ; at 39° C and in darkness, slight losses occur (25 p. 100 after a 6 months storage).

The exposition of milk to light brings about higher losses : after a 6 months storage in diffused light (at + 20° C) or in direct light (at + 39° C) these losses reach respectively 25 p. 100 and 75 p. 100.

2°. — The pyridoxine is stable when milk is kept in the freezer ; slight losses occur at + 20° C and + 39° C in darkness (respectively 20 p. 100 and 30 p. 100 after a 6 months storage).

The exposition of milk to light increases considerably the losses : after 2 weeks of storage in diffused light (at + 20° C) or in direct light (at + 39° C) the losses reach 25 p. 100 and 50 p. 100. After 6 months the losses are complete.

3°. — These observations confirm that in order to preserve its vitamin content, sterilized milk must not be exposed to light, even to diffused light. They show also that in order to prevent thiamine or pyridoxine losses, high temperatures must be avoided.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ATKIN L., SCHULTZ A. S., WILLIAMS W. L., and FREY C. N., 1943. Yeast microbiological methods for determination of vitamins. Pyridoxine. *Indutr. Engng. Chem.*, **15**, 141-144.

CAUSERET J., HUGOT D., GOULAS-SCHOLLER C., et MOCQUOT G., 1961. Évolution de la teneur du lait stérilisé en riboflavine et en vitamine A au cours d'une conservation de longue durée. *Ann. Technol. agric.*, (sous presse).

CHELDELIN V. H., BENETT M. J., and KORNBERG H. A., 1946. Modifications in the *Lactobacillus fermenti* 36 assay for thiamine. *J. biol. Chem.*, **166**, 779-780.

DEBRIT F. P., 1952. Étude de la vitamine B_6 dans le lait et les produits laitiers. *Internation. Z. Vitaminforsch.*, **24**, (3) 331-345.

HELLSTRÖM V.,
a) 1954. Destruction, par la lumière solaire, de la vitamine B_6 dans le lait (en suédois). *Vår Föda.*, **6**, (9) 36.
b) 1959. L'influence de la lumière solaire sur la teneur en vitamine B_6 du lait et certains problèmes connexes (en suédois). *Vår Föda.*, **11**, (8) 33-36.
c) 1960. The influence of sunlight on vitamin B_6 in milk. *Internation. Z. Vitaminforsch.*,, **30**, (3) 323-327.

MIJLL DEKKER L. P., VAN DER and ENGEL C., 1952. The vitamin A, B_1, B_2, and C contents of bottled sterilized milk during storage under various conditions. *Netherl. Milk Dairy J.*, **6**, (2) 104-108.

SARRET H. P., and CHELDELIN V. H., 1944. The use of *Lactobacillus fermentum* 36 for thiamine assay. *J. biol Chem.*, **155**, 153-160.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (1), 69-77.

RECHERCHES SUR LE DRAINAGE DES SILOS DE PULPES ET DE VERTS DE BETTERAVES

Évelyne DUVAL et L. HEDIN

Laboratoire de Recherches sur les Plantes fourragères, Rouen (Seine-Maritime).

SOMMAIRE

Après avoir amélioré le dispositif expérimental d'essais antérieurs, les auteurs ont étudié en 1959-1960 le drainage des pulpes et des verts de betteraves, chaque type d'ensilage avec ou sans drainage étant répété 5 fois.

Ils ont examiné l'évolution des températures, l'écoulement des jus et établi les bilans analytiques.

Après avoir discuté des résultats obtenus ils aboutissent à des conclusions qui ne sont pas très favorables au drainage.

I — INTRODUCTION

Dans un précédent mémoire (HEDIN L., DUVAL E., 1958) nous avons été amenés à examiner l'influence du drainage des silos sur la qualité des ensilages et sur les pertes de valeur alimentaire.

Nous nous permettrons de rappeler les conclusions que nous avions tirées de nos observations. Il ne semblait pas y avoir de différences importantes entre les silos de pulpes, qu'ils soient drainés ou non et en ce qui concerne les feuilles et collets non hachés de qualité très défectueuse, les pertes de matière sèche étaient augmentées par le drainage. Ces résultats étaient en contradiction avec ceux de certains auteurs.

C'est ainsi que BARNETT qui cite les résultats de DIJKSTRA concernant l'importance des pertes dues au drainage conseille celui-ci tout particulièrement quand on utilise le procédé A I V. En agronomie, ce genre de contradiction nous est bien connu, il résulte généralement de conclusions tirées de conditions expérimentales différentes.

Cependant, notre dispositif expérimental répondait assez mal à la comparaison envisagée puisque les silos « non drainés » reposant sur sol nu, une partie des jus pouvait se trouver absorbée.

D'autre part, les différentes analyses avaient porté sur la partie la plus sèche des ensilages et nous étions amenés à conclure que la quantité d'eau importante qui stagne dans le fond des silos étanches pouvait déterminer une pourriture de la masse ensilée et qu'il fallait drainer la majorité des silos.

Ces recherches nous ont montré les difficultés qu'il y avait à nous prononcer d'une façon affirmative sur la nécessité du drainage. Les principaux obstacles que nous avons rencontrés résultaient en premier lieu de l'hétérogénéité du matériel étudié. Il convenait donc d'aborder le problème de la même façon qu'il est procédé dans l'expérimentation agricole, c'est-à-dire avec un nombre de répétitions suffisant.

Utilisant les silos montés spécialement pour ces travaux à Criquetot-le-Mauconduit, nous avons fait porter en 1959-1960 nos investigations sur le drainage des pulpes et des verts de betteraves, chaque type d'ensilage avec ou sans drainage étant répété cinq fois.

Nous dirons tout d'abord quelles améliorations nous avons apportées au dispositif expérimental dont nous nous sommes servi précédemment. Nous rappellerons ensuite les techniques analytiques mises en œuvre, notamment celles que nous avons utilisées pour le dosage des acides volatils.

La présentation des résultats sera suivie d'une discussion.

II — MÉTHODES D'ÉTUDE

Dispositif expérimental.

Pour poser correctement le problème de l'intérêt du drainage, il convenait tout d'abord d'améliorer le dispositif expérimental de façon à bien distinguer les silos drainés de ceux qui ne l'étaient pas.

A cet effet, la batterie des 20 silos utilisés l'année précédente a été remontée sur une sole cimentée. Les 10 silos drainés comportaient un siphon et le volume des jus qui s'écoulaient était mesuré journellement.

Au désilage des essais effectués précédemment, il ne restait qu'une faible épaisseur de produit en bon état de conservation. Afin de mieux apprécier les pertes occasionnées par l'ensilage, nous avons doublé le volume de chaque silo par l'adjonction d'une deuxième buse de ciment. Nous disposions ainsi de silos de 2 m. de haut et 1 m. de diamètre dans lesquels nous avons mis environ 1 000 kg de feuilles et collets hachés ou 1 500 kg de pulpes.

Nous avons également apporté tous nos soins aux facteurs qui influencent la conservation. Le tassement a été effectué par piétinement d'homme à partir du fond du silo, les feuilles et collets ont été hachés, la couverture comprenait un couvercle de bois s'adaptant exactement sur la matière ensilée et chaque silo était coiffé d'un toit en pente qui empêchait la pénétration des eaux de pluie.

Techniques analytiques.

Les méthodes de dosages utilisées ont été décrites pour la plupart dans nos mémoires précédents (Hedin, Lefebvre, Duval, 1956 — Hedin, Duval, 1958). Nous signalerons que pour ce travail, les chiffres figurant dans les tableaux d'analyses alimentaires correspondent à des analyses effectuées à la Maison de l'Élevage de Bernay dont le Directeur est M. Delcure. C'est également dans son laboratoire qu'a été dosé l'acide lactique suivant la méthode de Lepper. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux dosages qui rendent compte de l'évolution fermentaire de la masse ensilée, principalement à l'estimation quantitative des acides volatils.

Les méthodes que nous avions utilisées précédemment (Duclaux, Lepper) présentaient l'inconvénient de ne donner que deux acides, acétique et butyrique dans le cas du « Lepper ». Cette détermination était erronée dès que dans l'ensilage analysé se trouvait de l'acide propionique ou d'autres acides supérieurs.

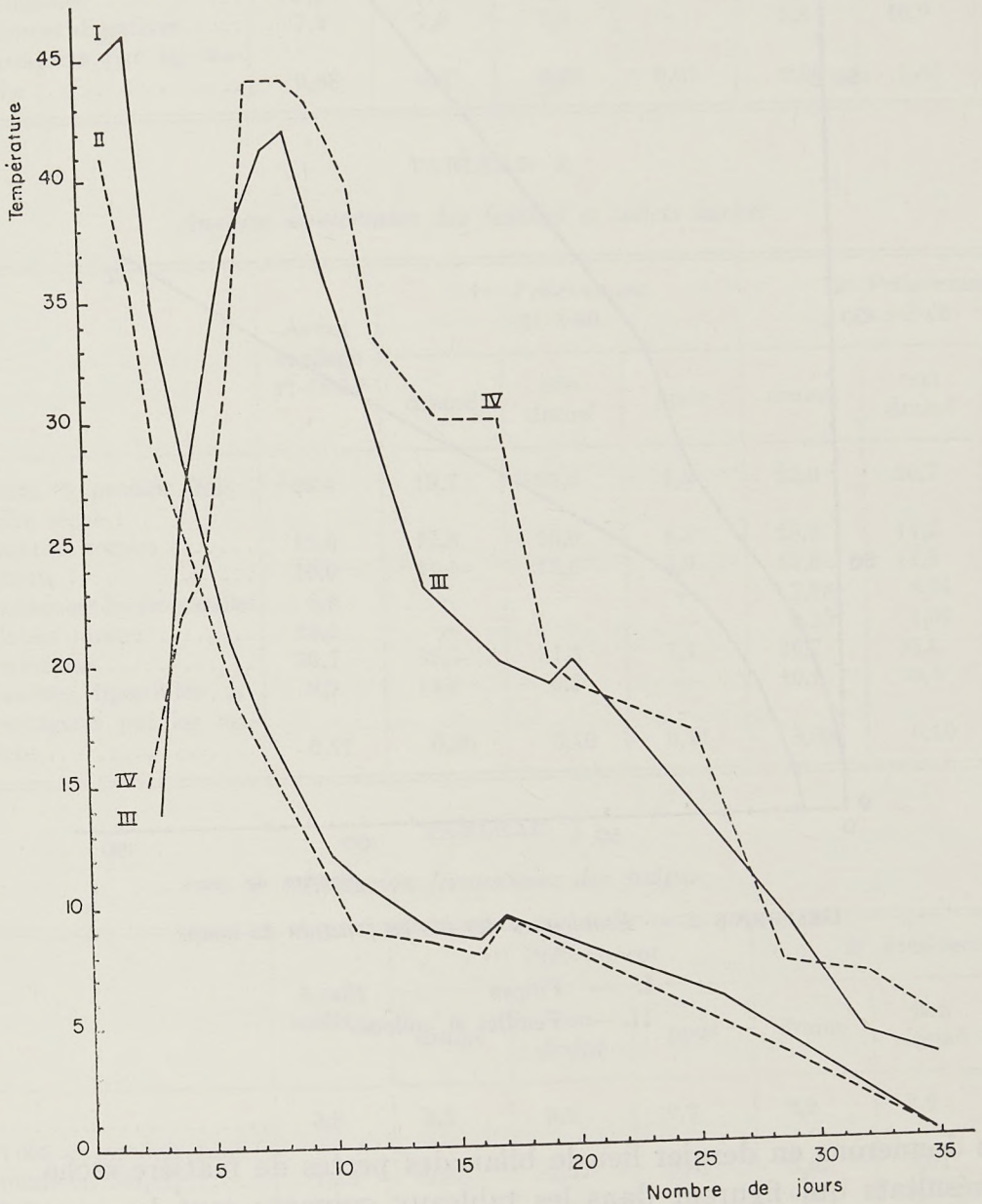
C'est pourquoi nous avons adopté la méthode chromatographique en phase gazeuse de James et Martin modifiée au Laboratoire annexé à la Chaire de Zootechnie de l'Institut national agro-

nomique. Elle comprend une extraction des acides gras volatils à partir de leur milieu biologique par une macération suivie d'une distillation, une séparation et un dosage quantitatif de ces acides par une chromatographie de partage gaz-liquide.

Nous avons pu obtenir de cette manière les teneurs exactes en acides acétique, propionique, butyrique et valérianique des ensilages étudiés.

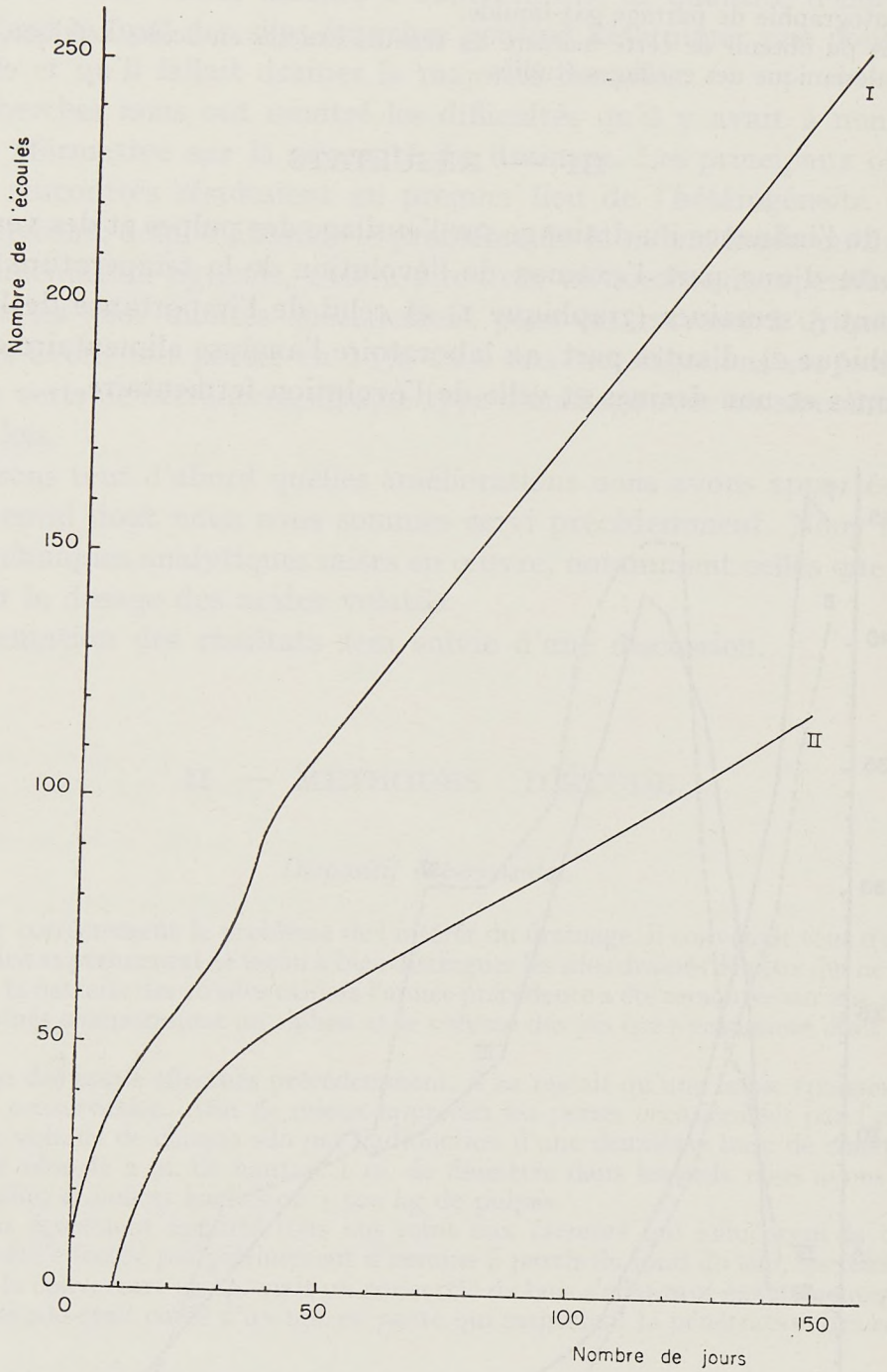
III — RÉSULTATS

L'étude de l'influence du drainage sur l'ensilage des pulpes et des verts de betteraves comporte d'une part l'examen de l'évolution de la température de la masse ensilée pendant 5 semaines (graphique 1) et celui de l'importance de l'écoulement des jus (graphique 2), d'autre part, au laboratoire l'analyse alimentaire comparative des silos drainés et non drainés et celle de l'évolution fermentaire.



GRAPHIQUE 1. — *Évolution de la température des silos.*

I-II Pulpes
III-IV Feuilles et collets
——— Silos non drainés
– – – – Silos drainés



GRAPHIQUE 2. — *Écoulement des jus en fonction du temps.*

I. — Pulpes
II. — Feuilles et collets

Nous donnerons en dernier lieu le bilan des pertes de matière sèche.

Les résultats qui figurent dans les tableaux suivants sont les moyennes des cinq répétitions. Nous avons également indiqué les plus petites différences significatives obtenues en faisant le calcul statistique par blocs de l'expérimentation.

TABLEAU I

Analyse alimentaire des pulpes

	Avant ensilage 14-12-59	1er Prélèvement 1-3-60			2e Prélèvement 16-5-60		
		drainé	non drainé	ppds	drainé	non drainé	ppds
Matière sèche % produit frais..	8,6	8,4	7,9	1,1	8,9	8,0	0,7
% Matière sèche :							
Matières azotées totales	12,1	14,2	15,4	5,1	19,5	21,9	3,6
Cellulose brute	19,5	24,0	23,9	1,0	21,9	23,3	2,2
Glucides facilement hydrolysables	29,0	—	—	—	24,96	25,68	8,36
Sucres solubles totaux	3,8	—	—	—	0,94	1,22	1,28
Matières minérales	5,8	5,4	5,2	0,7	6,8	7,6	1,4
Matières azotées digestives.....	7,9	7,0	7,6	—	9,8	10,9	—
Unités fourragères par kg matière sèche	0,88	0,87	0,88	0,02	0,86	0,85	0,03

TABLEAU 2

Analyse alimentaire des feuilles et collets hachés

	Avant ensilage 11-12-59	1er Prélèvement 11-3-60			2e Prélèvement 3-5-60		
		drainé	non drainé	ppds	drainé	non drainé	ppds
Matière sèche % produit frais .	23,4	19,7	19,5	1,8	22,0	20,7	2,4
% Matière sèche :							
Matières azotées totales	15,6	17,9	16,0	6,3	15,2	14,7	6,5
Cellulose brute	10,0	15,4	13,6	3,0	12,8	11,9	2,7
Glucides facilement hydrolysables	6,9	—	—	—	7,88	8,74	5,92
Sucres solubles totaux	13,2	—	—	—	0,15	1,02	0,47
Matières minérales	30,7	35,4	31,3	7,1	36,7	35,6	0,9
Matières azotées digestibles	9,7	11,0	9,5	—	10,1	9,3	—
Unités fourragères par kg matière sèche	0,47	0,39	0,46	0,11	0,38	0,40	0,02

TABLEAU 3

Evolution fermentaire des pulpes

	Avant ensilage	1er Prélèvement			2e Prélèvement		
		drainé	non drainé	ppds	drainé	non drainé	ppds
pH	3,8	3,5	3,6	0,2	3,9	3,9	—
Pour 1 000 de produit frais :							
Acidité totale en SO_4H_2	1,39	2,68	2,57	0,69	3,67	5,01	0,43
Acide lactique	1,9	—	—	—	4,3	4,7	0,6
Acide acétique	—	2,3	1,0	2,6	4,4	7,9	2,7
Acide propionique	—	0	0	—	0,3	0,5	0,4
Acide butyrique	—	0	0	—	0	0,2	0,4
Bases volatiles en NH_3	—	0,015	0,010	0,014	0,033	0,038	0,017

TABLEAU 4

Evolution fermentaire des feuilles et collets hachés

	Avant ensilage	1er Prélèvement			2e Prélèvement		
		drainé	non drainé	ppds	drainé	non drainé	ppds
pH	4,1	4,2	4,2	0,3	4,1	3,9	0,15
Pour 1 000 de produit frais :							
Acidité totale en SO_4H_2	4,41	8,94	8,09	5,7	10,41	11,91	0,96
Acide lactique	—	—	—	—	13,9	17,7	2,6
Acide acétique	—	9,0	8,0	4,6	10,1	11,0	2,5
Acide propionique	—	0,10	0	0,30	0,40	0,62	0,60
Acide butyrique	—	0	0	—	0	0	—
Bases volatiles en NH_3	—	0,602	0,608	0,254	0,814	0,724	0,213

TABLEAU 5

Bilan

	Silo drainé	Non drainé	ppds
Pertes silos pulpes % matière sèche	33	33	11,6
Pertes silos feuilles et collets % matière sèche	50	41	8,0

IV — DISCUSSION ET CONCLUSION

Sur l'évolution de la température

Pulpes.

L'observation du graphique 1 montre le peu de différence qui existe entre l'évolution des températures des silos drainés et non drainés de pulpes.

Feuilles et collets.

La température maximum atteinte par les feuilles et collets, 44°, est relativement élevée. Lors de l'essai précédent, on avait noté un maximum de 20°. Ce fait s'explique probablement par le mauvais état des verts ensilés en décembre 1959 dont certaines feuilles étaient jaunies et séchées. Leur teneur en matière sèche plus élevée a rendu le tassement moins efficace et l'air ainsi emmagasiné dans la masse a favorisé les phénomènes de respiration qui sont responsables de l'élévation de la température.

En ce qui concerne l'influence du drainage, on remarque que les silos drainés atteignent des températures un peu plus élevées qui s'abaissent moins rapidement, ce qui fait supposer qu'il se maintient, à l'intérieur de ces silos, une activité fermentaire supérieure. Cette explication semble trouver sa confirmation dans le fait que les feuilles et collets drainés contiennent au désilage une quantité de sucres solubles moins importante.

Sur l'écoulement des jus

Pulpes.

On notera sur la courbe d'écoulement des jus (graphique 2) un certain redressement vers le 20 janvier.

A cette époque nous avons noté une nette augmentation de la température ambiante qui expliquerait une intensification des phénomènes d'hydrolyse.

Le volume des jus perdus au moment du désilage atteint 250 l., ce qui correspond à une perte de matière sèche de 5 kg environ.

Feuilles et collets.

Cette courbe est beaucoup plus régulière pour les feuilles et collets sans doute par suite d'une équilibration moins étroite avec le milieu extérieur.

Le graphique des températures relatif aux verts montre l'existence de processus fermentaires se prolongeant plus longtemps que pour les pulpes.

La totalité des jus écoulés est d'environ 120 l. Cependant la plus grande richesse de ces jus en matière sèche occasionne des pertes du même ordre de grandeur que pour les pulpes.

Sur les résultats analytiques

Analyse alimentaire.

L'examen des tableaux 1 et 2 montre entre les pulpes drainées et non drainées une différence significative des taux de matière sèche, les pulpes non drainées étant plus humides au deuxième prélèvement que celles qui ont subi un drainage. On remarque également une teneur en glucides solubles plus élevée dans les silos de feuilles et collets non drainés.

Il n'y a aucune autre différence significative entre les silos drainés et non drainés de feuilles et collets ou de pulpes.

Évolution fermentaire.

En ce qui concerne l'évolution fermentaire des pulpes, on constate (tableau 3) que l'acidité totale est significativement plus importante au deuxième prélèvement dans les silos non drainés. Cet excès d'acidité est sous forme d'acides lactique et acétique.

Dans le cas des feuilles et collets, seul le taux d'acide lactique est significativement plus élevé dans les silos non drainés (tableau 4).

Sur les pertes de matière sèche

Si l'on n'observe pas de différence entre les pertes de matière sèche des silos de pulpes, qu'ils soient drainés ou non, il n'en est pas de même dans le cas des feuilles et collets où le drainage occasionne des pertes significativement plus importantes que le non-drainage (tableau 5).

Essais d'appréciation des ensilages analyses

Dans des recherches antérieures nous avons essayé d'évaluer la qualité des différents ensilages étudiés au moyen de rapports simples et à l'aide de barèmes d'appréciation.

Nous donnons dans le tableau 6 les valeurs de quelques-uns de ces rapports pour nos différents ensilages. Nous indiquons aussi les notes trouvées en utilisant le barème de M.S.Z.ZELTER. Ce critère fait intervenir les teneurs en acides acétique et butyrique et le pourcentage d'azote sous forme ammoniacale.

TABLEAU 6

	$\frac{\text{Acidité lactique}}{\text{Acidité tot. sulfur.}}$	$\frac{\text{N bases volatiles}}{\text{N total}} \times 100$	Note sur 20
1er Prélèvement :			
Pulpes :			
drainées	—	0,66	20
non drainées	—	0,40	20
Feuilles et collets :			
drainés	—	8,09	17
non drainés	—	9,12	18
2e Prélèvement :			
Pulpes :			
drainées	0,64	0,98	20
non drainées	0,51	1,10	20
Feuilles et collets :			
drainés	0,73	11,15	14
non drainés	0,80	10,91	15

L'étude du tableau 6 ne permet pas de distinguer sensiblement la qualité des différents ensilages. Cette sorte de test ne permet d'ailleurs d'apprécier que des différences importantes.

En conclusion dans nos conditions expérimentales, le drainage n'a paru un avantage marqué ni pour les pulpes ni pour les feuilles et collets, non seulement en ce qui concerne les pertes, mais aussi au point de vue de la qualité du produit ensilé. Bien au contraire, pour les feuilles et collets le non-drainage a permis de réduire les pertes de matière sèche.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée grâce à l'appui financier de l'Institut technique de la Betterave industrielle que nous remercions. M. WATTIEZ, agent régional de cet organisme, a mis en place les essais. A ce dernier, comme à M. MAGNIN, directeur de la distillerie de Criquetot-le Mauconduit, qui a bien voulu s'intéresser à ces essais, nous disons toute notre gratitude pour l'aide matérielle apportée.

Reçu pour publication en décembre 1961.

SUMMARY

STUDIES ON THE DRAINAGE OF BEET PULP AND LEAF SILOS

The studies which we heave alrady carried out had not allowed to conclude that the drainage of beet pulp and leaf silos is absolutely necessary.

The main difficulties that we met with were firstly the heterogeneity of the material studied, so it was necessary to study the problem in the same way as in agricultural research experiments, that is with sufficient repetitions. In the experiments carried out at Criquetot-le-Mauconduit, each type of silage of beet pulp and leaf with or without drainage has been repeated five times. We have used small covered silos containing 1 000 kg of cut leaves and collars or 1 500 kg of pulp.

The determination of volatile acids has been carried out by the JAMES and MARTIN method modified in the laboratory of M. S. ZELTER (Chaire de Zootechnie — Institut national agronomique).

The study of the effect of drainage on silage of pulp and leaf includes : 1) the study of temperature evolution and of the quantity of flowing juice — 2) the comparative food laboratory analysis of drained and not drained silages, and the study of the fermentative evolution.

The results showed in graphics and charts are the average of five experiments.

The study of the obtained results allows to claim that under realized experiment conditions the drainage does not seem to be useful.

The food analysis are indeed significantly identical ; as to the fermentative evolution, not drained silages have appeared to be slighty more acid than drained ones. The dry substances losses are the same in the case of pulp, but they are significantly more important for drained than for not drained leaves and collars.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Le présent travail complète un certain nombre de recherches que nous avons publiées précédemment et dont on trouvera la bibliographie dans les mémoires suivants :

HEDIN L., LEFEBVRE J. M., DUVAL E., 1956. Recherches sur l'ensilage des pulpes, des feuilles et des collets de betteraves sucrières. *Publ. I.T.B.*, 79-183.

HEDIN L., DUVAL E., 1958. Nouvelles recherches expérimentales et analytiques sur l'ensilage des pulpes, des feuilles et des collets de betteraves sucrières. *Publ. I.T.B.*, 57-110.

Indiquons que la référence citée de BARNETT est la suivante :

BARNETT A.J.G., 1954. Silage fermentation. *Butterworths scientific publications.*

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (1), 79-81.

CHRONIQUE DES LIVRES

ALAIS C. — SCIENCE DU LAIT ET PRINCIPES DES TECHNIQUES LAITIÈRES. — Éd. SEPAIC, Paris, 450 p.

Cet ouvrage présente un ensemble de notions fondamentales dont la connaissance peut être considérée comme indispensable à tous ceux qui s'intéressent à la Technologie laitière, à la production du Lait, à l'Hygiène et aux problèmes de la nutrition.

Ce livre de 450 pages est divisé en quatre parties et vingt chapitres; il est illustré de 58 figures et graphiques ; 71 tableaux apportent la documentation chiffrée essentielle. Chaque chapitre est précédé de l'énumération des questions traitées. Le texte comporte de nombreuses subdivisions facilitant la lecture. Dans une introduction sont présentées les notions générales sur les laits des différentes espèces et sur les produits laitiers.

La première partie est consacrée à la constitution et aux propriétés du lait, aux points de vue chimique, biochimique et physique. Les différents groupes de composants sont successivement étudiés : lactose et oligosaccharides, matières grasses et substances associées (caroténoïdes, stérols) ; protides : caséines (et plus particulièrement la caséine « Kappa », globulines, albumines, glycoprotéines et protides mineurs ; sels solubles et colloïdaux ; composants à activité biologique (vitamines, enzymes). Les modifications subies par les principaux composants, dans les altérations naturelles ou dans les transformations industrielles, sont considérées comme faisant partie de leurs propriétés et sont étudiées à la suite. La physique du lait est assez largement traitée : propriétés de la phase hydrique, acidité et phénomènes de dissociation, potentiel rédox, etc.

La deuxième partie est consacrée à la microbiologie et à l'hygiène. Le mode de contamination du lait, l'étude des groupes microbiens importants, les propriétés du lait considéré comme milieu de culture, les bactéries lactiques et les levains, les bactéries pathogènes des mammites et enfin les problèmes hygiéniques et l'assainissement du lait sont étudiés en cinq chapitres.

Les deux dernières parties couvrent le champ des applications pratiques importantes des notions fondamentales exposées dans les deux premières parties.

Cependant, dans la troisième partie, consacrée à la production du Lait, quelques notions nouvelles sont données concernant différents facteurs physiologiques et héréditaires de la sécrétion et de la composition du lait. Elles précèdent l'étude des conditions de la production dans les exploitations agricoles, de la récolte, de la conservation au froid et de la collecte du lait. L'appréciation de la qualité du lait et les bases du paiement à la qualité terminent cette partie. Dans la dernière partie sont étudiés le traitement du lait de consommation, la crème et le beurre, la fromagerie et diverses autres transformations.

Cet ouvrage tient compte des acquisitions scientifiques récentes. L'auteur a bénéficié, dans ce travail des avis de ses collègues de la Station centrale de Microbiologie et Recherches laitières du Centre national de Recherches zootechniques de Jouy-en-Josas.

Au point de vue de l'enseignement ce livre est en accord avec l'élévation générale du niveau des études techniques. Il manquait en langue française un ouvrage d'étude et de réflexion, dans cette matière.

MISES AU POINT DE CHIMIE ANALYTIQUE PURE ET APPLIQUÉE ET D'ANALYSE BROMATOLOGIQUE, publiées sous la direction de J. A. GAUTIER. — 9e sér. (16,5 × 22,5), Paris, Masson, 1961, 210 p.

Le présent ouvrage comprend huit articles :

I. — Utilisation de la chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse des médicaments, par L. DOMANGE et Mlle S. LONGUEVALLE (pp. 7-35)-8 réf. biblio.).

La première partie de cette mise au point rappelle les principes de l'utilisation de la chromatographie de partage gaz-liquide (avantages, l'interprétation des résultats sur les plans qualitatif et quantitatif). Dans la deuxième partie, les auteurs exposent les applications de cette technique dans le domaine particulier du contrôle des médicaments (essences végétales présentes dans les préparations pharmaceutiques). La méthode est élégante, rapide et plus précise que les méthodes traditionnelles.

II. — Les possibilités de la spectrophotométrie infrarouge en analyse fonctionnelle, par J. GUY (pp. 37-62, 2 réf. biblio.).

Cette mise au point cherche à convertir des chimistes à l'emploi de la Spectrophotométrie infrarouge en exposant dans ses grandes lignes ce que l'on est en droit d'en attendre. Après avoir rappelé les bases élémentaires des théories d'interprétation des spectres, l'auteur décrit les caractéristiques propres des niveaux de vibration dans le cas des molécules diatomiques, puis les niveaux de vibration des molécules polyatomiques et coordonnées normales. Des tableaux donnent les principales fréquences de vibration susceptibles d'être associées à des groupements fonctionnels.

III. — Tendances actuelles de la microanalyse organique, par R. LEVY (pp. 63-79).

La microanalyse n'est pas constituée par des techniques permettant d'intrapoler les méthodes macroanalytiques. Des phénomènes physico-chimiques apparaissent, qui n'étaient pas mis en évidence dans les domaines classiques. L'auteur cite des exemples. Il examine les instruments nouveaux mis à la disposition des micro-analystes, et les matériaux.

IV. — Nouveaux développements dans l'emploi de l'oxydation periodique, par P. MALANGEAU (pp. 81-107, 25 réf. biblio.).

Les possibilités d'emploi de l'acide periodique en matière d'analyse vont sans cesse en s'élargissant. Cet exposé se limite à l'étude de quelques acquisitions récentes touchant à l'action de l'acide periodique sur les polyols, les glucides et leurs proches parents. L'auteur examine plus particulièrement :

— Le mécanisme d'oxydation des cétoses par l'acide periodique.
— L'étude de l'oxydation periodique au cours de réactions ralenties.
— L'étude de l'oxydation periodique au cours de réactions incomplètes.
— L'oxydation periodique avec « super oxydation ».

V. — Méthodes de dégradations de l'hétérocycle indolique et leurs applications à l'analyse structurale, par C. MENTZER (pp. 109-126, 58 réf. biblio.).

L'auteur rappelle les mécanismes biogénétiques qui conduisent à l'indole et à ses divers dérivés naturels. Il traite plus particulièrement des procédés d'analyse qui concernent :

— 1° l'acide indol-β-acétique et ses analogues,
— 2° l'acide hydroxy-5-indolacétique,
— 3° les méthodes générales d'oxydation des indoles.

VI. — La spectrographie Raman et Infrarouge dans l'étude des fonctions acétylénique, allénique, éthylénique conjuguée, par M. MIOCQUE (pp. 127-154, 82 réf. biblio.).

L'auteur a voulu souligner l'intérêt des spectres Raman et infrarouge et aider les chimistes dans leur utilisation empirique au sein d'une série de composés insaturés. Dans une première partie il envisage les résultats obtenus dans l'étude de l'acétylène et des acétyléniques ; dans une seconde partie, il étudie l'allène et les alléniques. Les résultats sont groupés sous forme de tableaux.

VII. — Le problème des traitements des aliments par les radiations ionisantes, par P. NAVELLIER (pp. 155-179, 54 réf. biblio.).

L'auteur fait le point des connaissances actuelles : intérêt du traitement, production des radiations ionisantes, effets chimiques des radiations sur les constituants de la matière vivante et les qualités organoleptiques, valeur alimentaire des aliments irradiés (carence, toxicité, radioactivité résiduelle), action stabilisatrice des radiations. Exemples de traitements (viande, poisson, lait, etc).

VIII. — Progrès récents dans le contrôle des médicaments végétaux par chromatographie et électrophorèse sur papier, par R. PARIS (pp. 181-199, 66 réf. biblio.).

Dans une première partie l'auteur indique les principaux procédés d'extraction, de développement et de révélation. Il en donne quelques applications (alcaloïdes, holosides, hétérosides, etc.). Dans une seconde partie traitant de l'électrophorèse sur papier, il indique les conditions expérimentales et les résultats obtenus.

P. J.

Le Directeur-Gérant : M. L. CAGNAC.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 6-4-1962.

Dépôt légal : 2e trimestre 1962. *N° d'impression : 446.*

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (2), 85-105.

SUR LA FORMATION DES ALCOOLS SUPÉRIEURS PAR LES LEVURES DE VINIFICATION

E. PEYNAUD et G. GUIMBERTEAU

Station agronomique et œnologique, Bordeaux (Gironde).

SOMMAIRE

On sait que la fermentation alcoolique du sucre s'accompagne toujours de l'apparition d'alcools supérieurs ou huile de fusel. On a longtemps admis que cette formation s'effectuait uniquement à partir de certains aminoacides selon la réaction d'EHRLICH par désamination, décarboxylation et oxydo-réduction. Mais on a fait observer récemment que dans certains cas ce mécanisme seul ne peut expliquer toute la production d'alcools supérieurs et d'autres hypothèses de formation ont été formulées. Dans ce travail il est confirmé que la réaction d'EHRLICH ne peut rendre compte que d'une faible partie de la formation des alcools supérieurs des milieux naturels fermentés, particulièrement dans le cas de la fermentation du jus de raisin. L'assimilation azotée dans ces milieux suit des voies multiples et les alcools supérieurs peuvent être produits par des mécanismes indépendants de cette assimilation. Nous étudions enfin les divers facteurs de la fermentation qui influent sur la formation des alcools supérieurs.

INTRODUCTION

D'après nos analyses (PEYNAUD et GUIMBERTEAU, 1958) les vins renferment de 150 à 600 mg d'alcools supérieurs par litre. Nous avons utilisé pour les déterminer la réaction colorée obtenue avec la p. diméthylaminobenzaldéhyde en milieu sulfurique concentré. Les alcools supérieurs des vins sont constitués pour une proportion de 90 p. 100 ou davantage par un mélange d'alcool isoamylique et d'alcool isobutylique.

Les colorations développées par ces deux alcools dans la réaction avec la p. diméthylaminobenzaldéhyde étant très différentes, il est possible par des mesures d'absorption au spectrophotomètre effectuées à deux longueurs d'onde (440 et 530 mμ) d'estimer avec une approximation suffisante les taux de ces deux alcools en mélange ; les autres alcools n'interfèrent pas. Nous avons ainsi trouvé de 100 à 350 mg d'alcool isoamylique et de 40 à 200 mg d'alcool isobutylique par litre de vin ; le taux du premier domine toujours celui du second, qui représente en moyenne le quart des alcools supérieurs pour les vins rouges et le tiers pour les vins blancs. L'alcool isoa-

mylique est lui-même un mélange d'alcool isoamylique inactif (méthyl-3 butanol-1) et d'alcool amylique actif (méthyl-2 butanol-1), non différenciés dans le dosage.

Les moûts de raisin ne contiennent jamais d'alcools supérieurs ; ceux-ci apparaissent au cours de la fermentation alcoolique. On a admis, depuis les travaux d'Ehrlich (1906, 1907), que les huiles de fusel présentes dans les milieux fermentés sont formées par désamination et décarboxylation des aminoacides, réaction amenant la formation d'un alcool possédant un atome de carbone de moins que l'acide aminé correspondant. Ces travaux ont été confirmés par Neubauer (1911) et par Neuberg (1911). Ils ont été rappelés par Genevois (1952).

Mais, plus récemment, plusieurs auteurs, en particulier Thorne (1949, 1950), Barton-Wright (1951, 1952), constatant que tous les aminoacides n'ont pas la même valeur alimentaire pour les levures, devaient démontrer que le mécanisme d'Ehrlich ne résout pas entièrement le problème de l'assimilation azotée. Cette réaction ne s'applique d'ailleurs pas à tous les aminoacides assimilables ; elle n'est valable que pour la leucine, l'isoleucine, la phénylalanine, la tyrosine (Ehrlich, 1911), le tryptophane (Ehrlich, 1912), la valine. L'acide glutamique donne de la même façon de l'acide succinique, mais on sait aujourd'hui que seulement une part restreinte de l'acide succinique de fermentation est due à cette transformation, dans le vin tout au moins, la presque totalité provenant de la molécule de sucre elle-même, à titre de produit secondaire de la fermentation glycéropyruvique (Genevois, 1952 ; Peynaud, 1948 ; Peynaud et Lafon 1952 ; J. Ribéreau-Gayon et *al.*, 1955).

Ehrlich avait admis que les levures peuvent former des alcools supérieurs aux dépens de leurs propres protéines, quand l'apport extracellulaire de substances azotées convenables devient insuffisant, en solution de sucre pur par exemple. Les alcools supérieurs seraient alors formés par une autofermentation des cellules vivantes et actives, et non point d'ailleurs par une autolyse des cellules mortes. De la même façon, on a pu imaginer une synthèse continue de leucine, d'isoleucine et de valine, dont l'excès serait au fur et à mesure fermenté et donnerait naissance aux alcools supérieurs correspondants. Les teneurs de ces trois aminoacides dans les levures restent assez constantes dans des conditions de fermentation très différentes.

On considère actuellement que l'assimilation de l'azote peut s'effectuer encore selon deux voies différentes : d'après la réaction de Stickland (1934) et par assimilation directe des aminoacides du milieu (Thorne, 1949, 1950). Ces questions ont été déjà traitées par J. Ribéreau-Gayon et Peynaud (1960) ; nous y renvoyons le lecteur.

La plus forte proportion des aminoacides des levures serait prélevée directement au milieu. La désamination selon les autres mécanismes serait seulement nécessaire quand le mélange des aminoacides présents ne convient plus exactement aux levures. Selon cette théorie, l'assimilation de l'azote n'impliquerait pas forcément la formation d'alcools supérieurs.

Réactions de transamination.

Les processus de transamination ont été indiqués comme des modes possibles de formation des alcools supérieurs. Antoniani et *al.* (1948, 1957) ont observé par exemple que le glycocolle, l'α-alanine, la cystine ajoutés à un substrat artificiel de

fermentation, donnent lieu à la formation de quantités notables d'alcools supérieurs. Ces auteurs voient dans cette formation la preuve de l'existence de phénomènes de transamination chez les levures.

La transamination consiste dans le transfert du groupe aminé NH_2 et de l'hydrogène du carbone voisin d'un aminoacide, sur des molécules d'acides α-cétoniques. Le transfert est réalisé à l'aide de systèmes diastasiques spécifiques, les transaminases. On peut écrire la réaction sous la forme générale :

Aminoacide 1 + cétoacide 2 ⇄ cétoacide 1 + aminoacide 2.

On connaît en particulier le système suivant :

Ac. glutamique + ac. α cétoisocaproïque ⇄ ac. α-cétoglutarique + leucine.

La formation de leucine est donc possible par transamination. Elle exige la présence de l'acide cétonique correspondant, l'acide α-cétoisocaproïque. Dans la fermentation par les levures alcooliques, l'accepteur spécifique de NH_2 avec formation de valine serait, d'après Antoniani et *al.* (1957), l'acide α-cétoisovalérianique, lequel conduit à l'alcool isobutylique par décarboxylation et réduction. Cependant la transamination n'est qu'une circulation de NH_2, elle ne détermine pas la « fermentation » de l'acide cétonique. Il n'est pas nécessaire que celui-ci soit aminé pour être décarboxylé et réduit. On peut admettre une formation d'alcool isoamylique dans le sens : leucine + ac. pyruvique → ac. α-cétoisocaproïque + alanine, mais pas dans le sens contraire. Les réactions de transamination n'appuient donc pas la formation selon la réaction d'Ehrlich, mais au contraire la concurrencent.

Formation des alcools supérieurs à partir du sucre.

Castor et Guymon (1952) ont étudié le mécanisme de la formation des alcools supérieurs en suivant dans un jus de raisin en fermentation l'évolution de leur taux, parallèlement à la disparition de l'isoleucine, de la leucine et de la valine, déterminées par essais microbiologiques. Ces auteurs observent que ces aminoacides sont assimilés dans les premières 36 heures, mais que la formation des alcools supérieurs continue jusqu'à la fin du phénomène et coïncide avec la production d'alcool éthylique. D'autre part, en fin de fermentation, le taux des alcools supérieurs trouvés dépasse de loin la quantité théorique basée sur la disparition des aminoacides impliqués. Non seulement il y a décalage entre l'assimilation des aminoacides et l'apparition des alcools supérieurs, mais encore il n'y a aucune relation quantitative entre ces deux phénomènes. Les auteurs reconnaissent que d'autres explications seraient plus satisfaisantes que le mécanisme d'Ehrlich pour rendre compte de cet excès d'huile de fusel sur la théorie.

En faisant fermenter du saccharose en milieu synthétique par des levures à l'abri de l'air, avec addition de traces d'acétate marqué sur le méthyle, Genevois et Mlle Lafon (1956-1957) ont constaté la présence de carbone marqué dans les acétates, succinates, citrates, ainsi que dans les alcools amylique et isopropylique du milieu fermenté. La formation d'alcool isoamylique est théoriquement possible à partir de l'acétaldéhyde issue de la fermentation glycéropyruvique, en passant par les stades acide acétique, acétone, aldéhyde β-méthylcrotonique (Genevois, 1954). Suivant

ce mécanisme, trois mmol d'acétaldéhyde seraient nécessaires pour donner une mmol d'alcool isoamylique. L'essentiel des huiles de fusel proviendrait ainsi directement de la molécule de sucre. Les auteurs n'ont pas envisagé l'origine de l'alcool isobutylique.

Thoukis (1958) pense également qu'une partie de l'alcool isoamylique vient du sucre. Cet auteur a repris l'étude du mécanisme de la formation d'alcool isoamylique en utilisant de la leucine et de l'isovaléraldéhyde marquées par du carbone radioactif et en déterminant le pourcentage d'alcool isoamylique radioactif dérivé de ces précurseurs. Ses essais montrent qu'un pourcentage plus faible dérive de la leucine ^{14}C que de l'isovaléraldéhyde ^{14}C ; cet auteur propose donc deux voies distinctes de formation ayant toutes deux l'isovaléraldéhyde comme produit intermédiaire, l'une à partir de la leucine, l'autre à partir de la molécule de glucides.

Nous pensons avoir nous-mêmes démontré en 1959, dans des recherches qui sont développées plus loin, que les alcools supérieurs d'un produit fermenté ne sont formés que pour une part assez minime à partir de la leucine, de l'isoleucine et de la valine du milieu initial, selon la réaction d'Ehrlich, qu'il s'effectue une production importante à partir des autres aminoacides et qu'une partie des alcools supérieurs provient directement de la molécule de sucre. Dans le cas d'assimilation de la leucine, de l'isoleucine et de la valine par les levures, la désamination selon la réaction d'Ehrlich n'est pas non plus le seul processus et une certaine proportion de ces aminoacides est assimilée selon d'autres voies.

Nous avons fait encore remarquer, avec J. Ribéreau-Gayon (1959), que les taux de leucine, d'isoleucine et de valine des moûts de raisin ne justifiaient pas la formation élevée d'alcools supérieurs que l'on constate habituellement. Dans une série de dosage les teneurs des moûts ont varié de 9 à 32 mg par litre pour la leucine, de 0 à 32 mg pour l'isoleucine ; quelques moûts sont même dépourvus d'isoleucine assimilable. En supposant donc que la totalité de ces aminoacides soit assimilée selon la réaction d'Ehrlich et donne quantitativement de l'alcool isoamylique, la composition moyenne des moûts de raisin permettrait d'expliquer seulement la formation de 18 mg de cet alcool, alors que la teneur moyenne des vins analysés est de 270 mg par litre pour les vins rouges et 164 mg pour les vins blancs. On peut faire le même raisonnement pour la valine, qui n'est pas présente dans tous les moûts et dont le taux maximum ne dépasse pas 24 mg ; la teneur en alcool isobutylique ne devrait pas elle-même dépasser 16 mg dans les vins. La réaction d'Ehrlich à partir de la leucine, de l'isoleucine et de la valine des moûts suffit donc à peine à expliquer la dixième partie de la formation des alcools supérieurs des vins.

La formation des alcools supérieurs à partir de la molécule de sucre est d'ailleurs facile à démontrer. Lorsqu'on provoque la fermentation du saccharose dans un milieu qui ne contient que des cendres de levures, du sulfate d'ammonium, des phosphates, des facteurs de croissance à l'état de traces, c'est-à-dire qui ne contient comme substance carbonée que du saccharose, et comme substance azotée que des sels d'ammonium, on constate une formation sensible d'alcools isoamylique et isobutylique. Il est évident que dans ces conditions expérimentales ces alcools ne peuvent être formés qu'à partir du sucre, quel que soit par ailleurs le mécanisme de cette formation.

D'après Genevois et Baraud (1959), « les synthèses des constituants des fusels par la levure nous apparaissent aujourd'hui comme des étapes des synthèses que la

levure réalise pour constituer sa propre substance, ce sont des matériaux à peine transformés qui ont échappé à la levure au cours de son travail. L'acide succinique illustre bien cette conception : l'acide succinique est partiellement utilisé par la levure pour faire la synthèse du noyau porphyrinique de ses cytochromes, de son ferment respiratoire. Les produits dits secondaires de la fermentation alcoolique, sont en réalité des produits fondamentaux de la vie de la levure ».

Pour INGRAHAM et GUYMON (1960), s'il est certain que des alcools supérieurs peuvent être formés à partir des acides aminés du milieu par la voie indiquée par EHRLICH et par NEUBERG, il semble qu'une part considérable, estimée aux trois quarts, soit formée dans le jus de raisin à partir des glucides. Par utilisation de mutants de levures obtenus par irradiation aux rayons ultra-violets et exigeant pour leur croissance soit la leucine, soit l'isoleucine, soit la valine, c'est-à-dire ayant perdu leur pouvoir de synthèse vis-à-vis de ces aminoacides, les auteurs ont observé des formations très déficitaires des alcools supérieurs correspondants. Ainsi les levures qui ne peuvent pas synthétiser la leucine ne peuvent pas former non plus d'alcool amylique inactif ; celles qui ne synthétisent pas l'isoleucine, ne forment pas d'alcool isoamylique et celles qui ne synthétisent pas la valine, ne donnent pas d'alcool isobutylique. Il existe un même processus de synthèse pour un précurseur commun aux aminoacides et aux alcools supérieurs correspondants, un acide cétonique vraisemblablement. Ce précurseur, dérivé des glucides, pourrait être à un certain stade soit aminé, soit décarboxylé. La formation des alcools supérieurs ne dériverait pas de l'assimilation azotée ; elle lui serait parallèle, mais elle serait indépendante. Ces mêmes auteurs avec CROWELL (1961) devaient étayer leur hypothèse par une nouvelle expérimentation utilisant des précurseurs possibles (acide α-aminobutyrique par exemple) marqués par leurs carbones radioactifs.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

1. — INFLUENCE DE LA NATURE DE L'ALIMENTATION AZOTÉE

Courbe de formation des alcools supérieurs

Dans nos premiers essais le matériel d'étude était constitué par divers moûts de raisin fermentant spontanément ou après stérilisation et ensemencement à l'aide de diverses souches de *Saccharomyces*. On déterminait journellement la quantité de sucre fermenté et la teneur en alcools supérieurs formés. Dans quelques cas les dosages portaient encore sur les alcools isoamylique et isobutylique, déterminés individuellement. La courbe de formation de ces alcools était tracée en fonction du sucre fermenté. Les fig. 1 et 2 donnent des exemples des résultats obtenus. Dans le premier cas, un moût de 220 g de sucre fermente à 25°C, d'une part en flacon bouché d'un tampon d'ouate (semi-aérobiose) et d'autre part en flacon bouché d'un barboteur interdisant l'entrée d'air (anaérobiose). La fig. 2 se rapporte à la fermentation d'un moût de raisin de 192 g de sucre en présence ménagée d'air ; on a suivi dans ce cas l'évolution individuelle des alcools isoamylique et isobutylique.

L'aspect des courbes obtenues avec les moûts de raisin et autres milieux naturels permet de distinguer deux périodes dans la formation des alcools supérieurs. Une première phase de formation rapide correspondant à la fermentation des premiers 25 à 50 g de sucre. On peut estimer que les alcools supérieurs formés dans cette période constituent la moitié du taux atteint à la fin de la fermentation. La seconde phase correspond à une formation continue, régulière, représentée assez bien par une droite se poursuivant jusqu'à la fin du phénomène. Par la suite dès que tout le sucre a disparu la formation cesse ; l'autolyse des levures, aussi prolongée soit-elle, ne s'accompagne pas d'une formation d'alcools supérieurs.

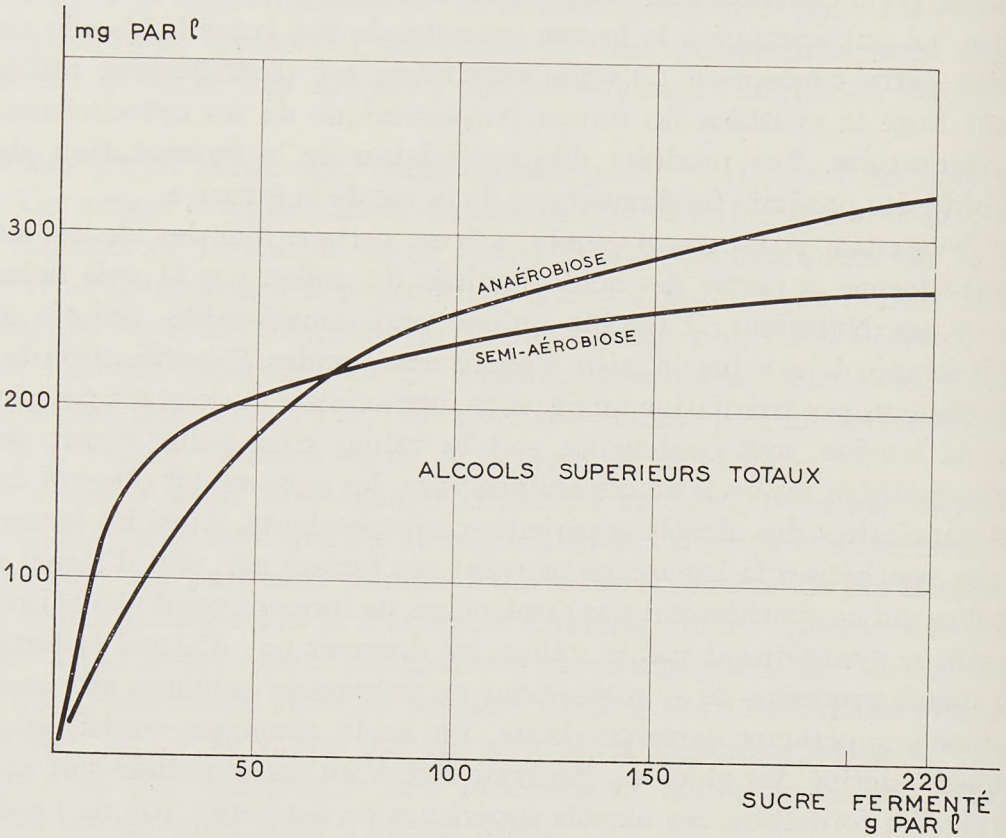

mg PAR ℓ
300
200
100
ANAÉROBIOSE
SEMI-AÉROBIOSE
ALCOOLS SUPERIEURS TOTAUX
50
100
150
220
SUCRE FERMENTÉ
g PAR ℓ

FIG. 1.

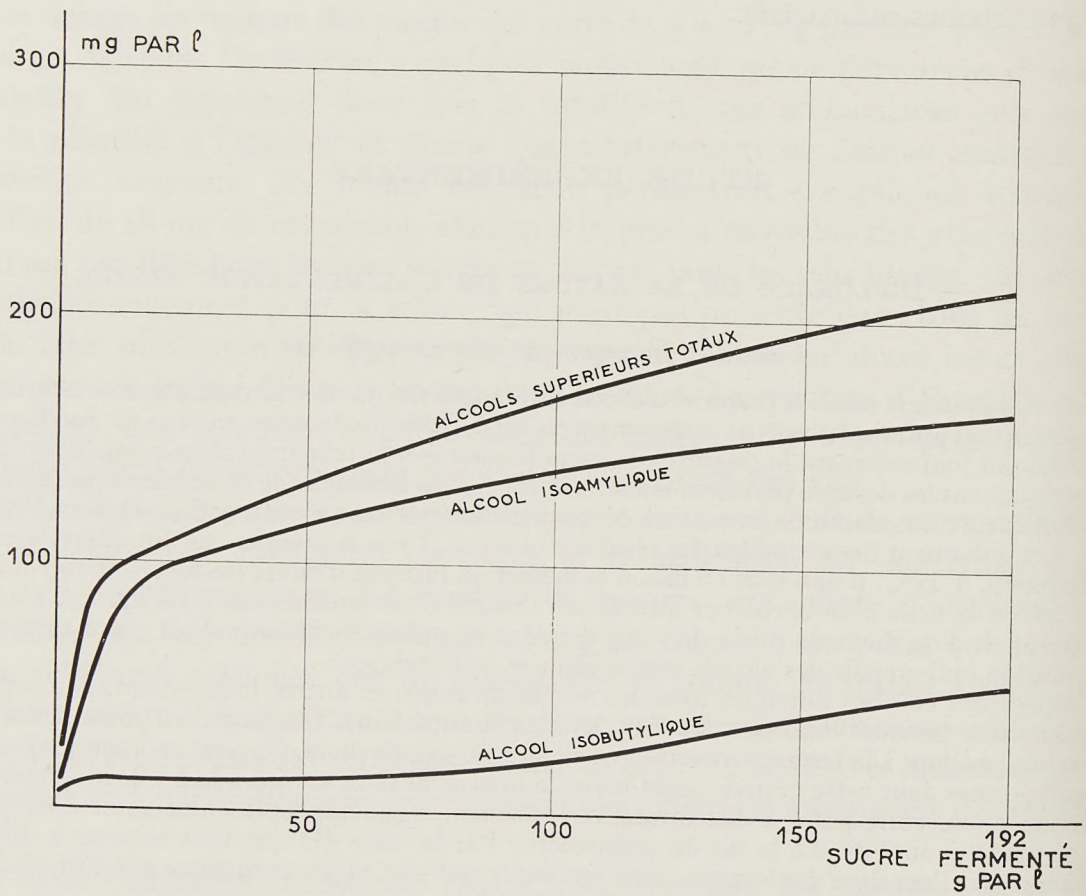

mg PAR ℓ
300
200
100
ALCOOLS SUPERIEURS TOTAUX
ALCOOL ISOAMYLIQUE
ALCOOL ISOBUTYLIQUE
50
100
150
192
SUCRE FERMENTÉ
g PAR ℓ

FIG. 2.

La formation d'alcool isobutylique est faible au début de la fermentation ; elle est progressive ; sur le graphique elle prend l'allure d'une droite. C'est donc la formation d'alcool isoamylique qui donne à la courbe des alcools supérieurs sa physionomie particulière, dessinant deux phases distinctes.

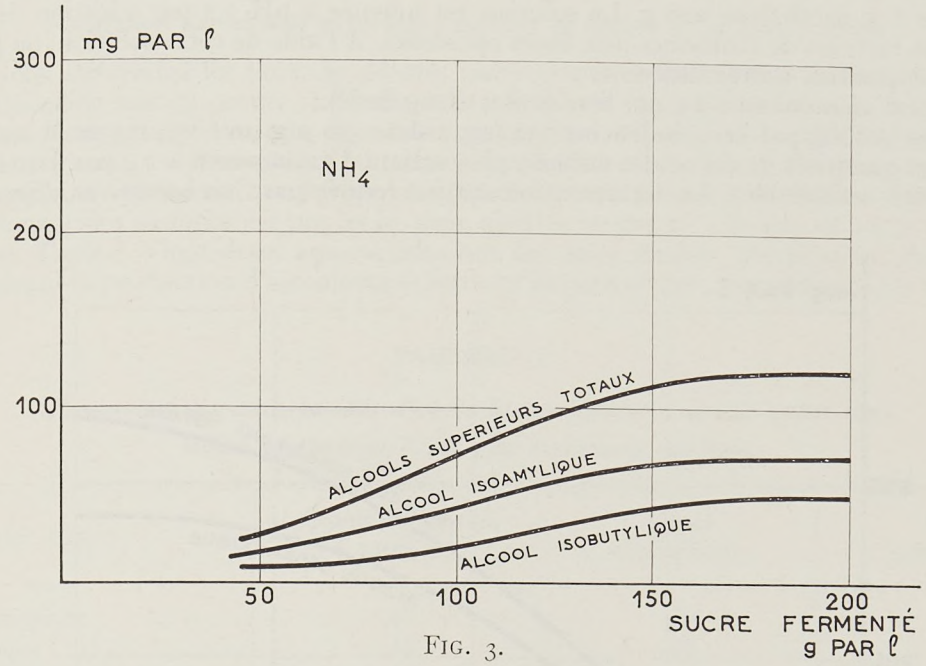


FIG. 3.

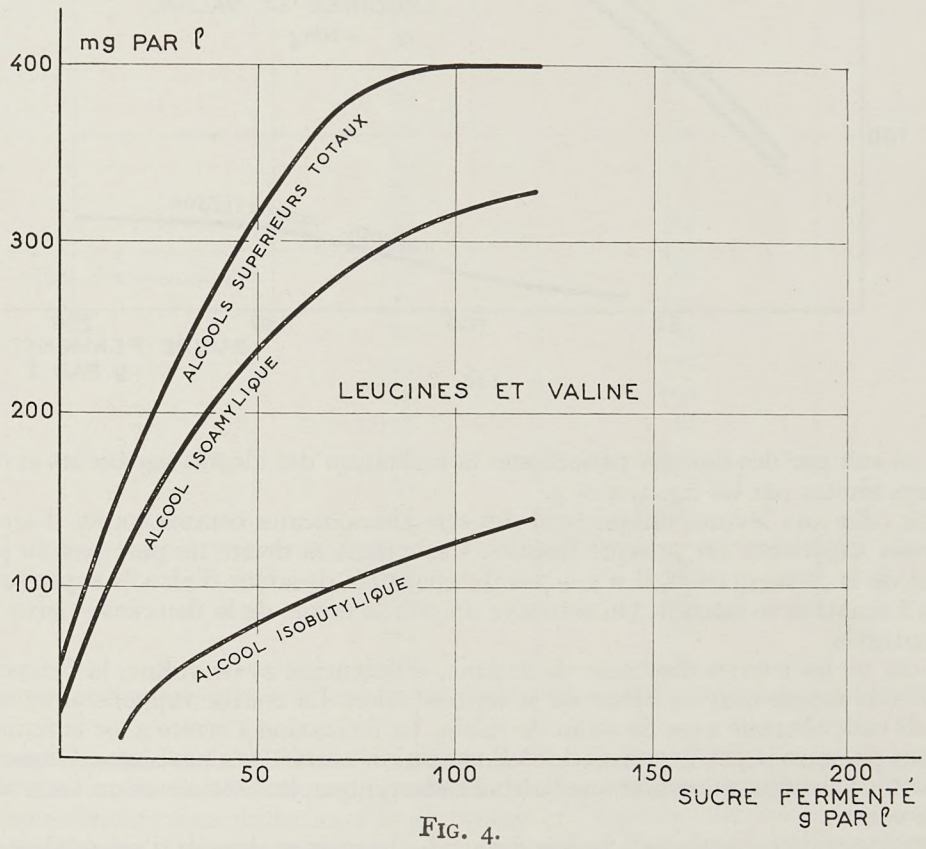


FIG. 4.

Ces résultats ne cadrent pas exactement avec ceux d'autres auteurs ayant suivi de même la formation des alcools supérieurs. Ces divergences proviennent d'expérimentations avec des milieux de culture différents. CASTOR et GUYMON (1952), on l'a vu, enregistrent une formation élevée à la fin de la fermentation ; il en est de même pour GLIMM et STENZEL (1931). Par contre, d'après VILLFORTH et SCHMID (1954), la teneur en huile de fusel augmente proportionnellement avec la formation d'alcool. Pour VESSELOV (GENEVOIS, 1961), les alcools supérieurs se forment au cours de la multiplication des cellules.

Effectivement dans d'autres conditions de formation, en milieu artificiel et avec certaines sources azotées, on peut obtenir des formes de courbes différentes, affectant dans certains cas l'aspect d'une droite. Dans l'essai suivant, le milieu de culture choisi est entièrement synthétique ; la solution de base dépourvue d'azote contient par litre : cendres de levures 4 g, phosphate monopotassique 2 g, acide citrique 6 g, saccharose 200 g. La solution est amenée à pH 3,5 par addition de potasse ; on ajoute tous les facteurs de croissance aux doses optimales. A l'aide de cette solution, on prépare trois milieux de composition azotée différente :

1° sulfate d'ammonium à 2 g par litre (soit 418 mg de N) ;

2° leucine 700 mg par litre, isoleucine 350 mg, valine 350 mg (soit 154 mg de N assimilable) ;

3° mêmes quantités de ces acides aminés, plus sulfate d'ammonium à 2 g par litre (soit au total 571 mg d'azote assimilable). La fermentation est provoquée par *Saccharomyces ellipsoideus*. Dans

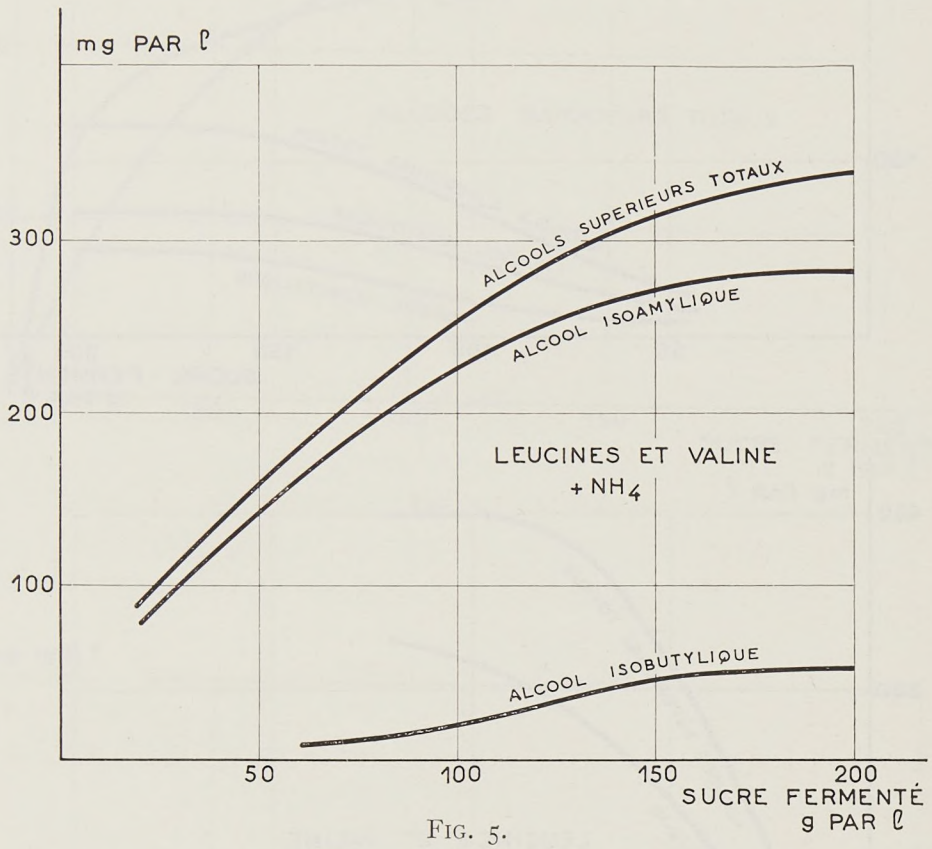


FIG. 5.

chaque série on suit par des dosages périodiques la formation des alcools supérieurs et on trace ainsi les courbes reproduites par les fig. 3, 4 et 5.

Lorsqu'on offre aux levures uniquement des sels ammonicaux comme source d'azote, la formation des alcools supérieurs est presque linéaire. Cependant la droite ne part pas du point zéro et, tout au début de la fermentation, il n'y a pas de quantités dosables d'alcools supérieurs ; de même vers la fin, la formation se ralentit. On retrouve un peu la forme de la deuxième partie de la courbe des milieux naturels.

Dans le cas où les levures disposent de leucine, d'isoleucine et de valine, la formation d'alcools supérieurs est très rapide tout au début de la fermentation. La courbe rappelle alors un peu la première partie de celle obtenue avec du moût de raisin. La formation s'arrête avec la fermentation, qui ici ne s'est pas poursuivie par insuffisance d'alimentation azotée. L'alcool isoamylique apparaît dès le début et est toujours plus abondant que l'alcool isobutylique, les leucines étant trois fois plus abondantes que la valine.

Enfin dans le milieu contenant à la fois des acides aminés et des sels d'ammonium, la formation des alcools supérieurs est freinée dès le début. L'allure de la courbe montre qu'elle est régulièrement ralentie. C'est surtout la formation de l'alcool isobutylique qui est gênée et finalement il n'y a pas davantage de cet alcool que dans le cas où la fermentation se déroule sans valine. On retrouve dans les grandes lignes l'aspect des courbes obtenues dans les milieux naturels.

Les formes assez variées des courbes indiquent que la formation des alcools supérieurs ne se fait pas selon un processus unique et qu'il existe plusieurs modes de formation. Mais le seul aspect du phénomène ne permet pas de préciser quels en sont les mécanismes. La réaction d'EHRLICH est une réalité, au moins partiellement, lorsqu'on offre l'azote aux levures uniquement sous forme de leucine,

d'isoleucine et de valine ; la formation des alcools supérieurs suit bien alors la croissance des levures. Mais le phénomène est entièrement différent lorsque les levures ont à leur disposition des sels ammoniacaux ou d'autres sources azotées.

Formation des alcools supérieurs suivant la nature de la source azotée

Nous avons déterminé les taux des alcools isobutylique et isoamylique formés par les levures suivant l'aminoacide mis en œuvre. Le milieu de culture est une solution simple, analogue à celle précédemment décrite, sucrée à 100 g de saccharose par litre, dépourvue de substances azotées, mais contenant tous les autres éléments et facteurs de croissance nécessaires, aux doses optimales. On ensemence avec une souche de *Saccharomyces ellipsoideus*, en présence de sulfate d'ammonium ou des divers aminoacides assimilables par les levures, ajoutés un par un à la dose de 2 g par litre comme unique source d'azote. Vingt-deux aminoacides ont été ainsi étudiés. On peut les classer en trois catégories suivant la production d'alcools supérieurs qu'ils permettent, reproduite par le tableau 1.

TABLEAU I

Classement des aminoacides d'après la production d'alcools supérieurs

Milieu synthétique à 100 g de saccharose par litre.

Source azotée	Alcools supérieurs totaux	Alcool isoamylique	Alcool isobutylique
Sulfate d'ammonium	47	30	17
Acide aspartique	45	37	8
Acide glutamique	47	15	32
α-alanine	37	0	37
Arginine	30	—	—
Asparagine	45	31	14
Glutamine	30	—	—
Ornithine	55	26	29
Phénylalanine	75	49	26
Tryptophane	55	5	50
Tyrosine	77	62	15
Asparagine + sulfate d'ammonium.	132	66	66
Cystéine	117	53	64
Cystine	97	39	58
Glycocolle	172	102	70
Histidine	145	103	42
Méthionine	145	68	77
Proline	150	110	40
Sérine	155	78	77
Thréonine	147	130	17
Isoleucine	410	367	43
Leucine	430	430	0
Norleucine	382	356	26
Valine	305	70	235

1° Aminoacides donnant une formation d'alcools supérieurs de l'ordre de 50 mg par litre dans les conditions de l'essai, plus élevée lorsque la quantité de sucre fermenté est plus importante. La formation est un peu inférieure à ce chiffre avec la glutamine et l'arginine, un peu supérieure avec la tyrosine et la phénylalanine. On remarque qu'elle est exactement du même ordre que dans le cas où les levures ne disposent que de sulfate d'ammonium comme aliment azoté. Il y a généralement dans ces conditions, en moyenne, à peu près autant d'alcool isobutylique que d'alcool isoamylique. Cette formation peut provenir directement de la molécule de sucre.

Les sources d'azote suivantes se classent dans cette catégorie : sels ammoniacaux, α-alanine, arginine, asparagine, acide aspartique, acide glutamique, glutamine, ornithine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine.

La proportion ainsi formée est généralement d'une millimolécule de chacun des deux alcools pour 180 à 200 g de sucre fermenté. Il ne paraît pas techniquement possible à cause de cette formation

de base d'abaisser dans une fermentation le taux de ces alcools à moins de 1 à 2 p. 100 de l'alcool éthylique ; les milieux à base de glutamine ou d'arginine seules donnent le taux minimum d'huile de fusel.

Les levures sont donc capables de former de petites quantités d'alcools supérieurs dans un milieu de culture absolument privé de leucines et de valine, et même dans un milieu privé d'acides aminés où tout l'azote se trouve sous la forme minérale.

2° Aminoacides (autres que la valine, la leucine, l'isoleucine) donnant des quantités plus importantes, de l'ordre de 100 à 150 mg par litre dans les conditions de l'essai, pouvant être formés à parties égales d'alcool isoamylique et d'alcool isobutylique ou avec un excès du premier sur le second. Dans cet essai où les levures utilisent 150 à 200 mg d'azote par litre, on enregistre une formation supplémentaire par rapport à la première catégorie d'une centaine de mg. Les aminoacides suivants se conduisent de la sorte : cystéine, cystine, glycocolle, histidine, méthionine, proline, sérine, thréonine. Le taux d'alcools supérieurs dépend de la quantité d'aminoacides mis en œuvre.

Deux hypothèses peuvent être imaginées pour expliquer cette formation : ou bien un phénomène de transamination, ou bien une formation à partir du sucre à titre de produits secondaires ; dans ce dernier cas, la formation serait facilitée par la présence de ces aminoacides.

Il est en outre intéressant de noter que le couple acide aspartique-azote ammoniacal permet la formation d'une quantité d'alcools supérieurs plus élevée que chacun des deux éléments pris à part. L'apport d'un sel ammoniacal à un milieu à base d'asparagine augmente le taux des alcools supérieurs, alors qu'en présence de leucine, d'isoleucine ou de valine, il le diminue.

3° Aminoacides donnant directement des alcools supérieurs par la réaction d'EHRLICH ; la quantité formée est dans les conditions de l'essai de 300 à 400 mg par litre, la quantité d'alcool isoamylique est proportionnelle aux taux de leucine et d'isoleucine et la quantité d'alcool isobutylique aux taux de valine. Cependant une fraction seulement de ces aminoacides utilisés par les levures est transformée en alcools supérieurs. De la fraction restante une partie est directement fixée et se retrouve dans les levures, une autre est transformée en d'autres aminoacides.

En résumé, ces résultats démontrent que, dans la fermentation d'un moût de raisin comme dans celle d'un milieu simple, la réaction d'EHRLICH n'est ni le principal mécanisme d'assimilation d'aminoacides tels que la leucine, l'isoleucine, la valine, ni la principale cause de formation des alcools supérieurs.

Influence du taux des aminoacides

Nous avons essayé de fixer la relation qui peut exister entre le taux des alcools supérieurs formés et les taux de leucine et de valine du milieu. L'expérience est conduite avec la solution simple précédente, sucrée à 192 g par litre ; on offre aux levures comme source d'azote un seul de ces aminoacides, sous la forme L, à doses croissantes allant de 100 à 2 000 mg par litre. On se place ainsi dans les conditions les meilleures pour le processus d'EHRLICH. Le tableau 2 reproduit les résultats analytiques de cet essai.

TABLEAU 2

Influence des taux de leucine et de valine

Teneurs en mg par litre ; le sucre est exprimé en g par litre.

Doses d'aminoacides	Sucre fermenté	Alcools supérieurs totaux	Alcool isoamylique		Alcool isobutylique	
			Théorique (1)	Dosé	Théorique (1)	Dosé
Leucine						
100	100	132	67	110	0	22
200	191	182	134	160	0	22
500	191	277	261	154	0	16
1 000	191	445	670	422	0	23
2 000	172	600	1 340	570	0	30
Valine						
100	107	125	0	80	63	45
200	144	145	0	80	126	65
500	191	182	0	75	316	107
1 000	191	245	0	73	632	172
2 000	191	300	0	73	1 264	222

(1) En supposant l'assimilation complète selon la réaction d'EHRLICH.

L'augmentation du taux de leucine ou de valine entraîne la formation de quantités plus importantes des alcools correspondants. Cependant on remarque que pour les faibles quantités de leucine (100 à 800 mg par litre) la formation d'alcool isoamylique est bien supérieure à celle prévue par la théorie d'EHRLICH. Il existe donc d'autres voies de formation. Au contraire pour les doses fortes, le taux d'alcool formé est très inférieur aux doses théoriques. Il existe donc d'autres modes d'assimilation.

On constate encore, en présence de leucine seule et quelle qu'en soit la dose, toujours la même faible formation d'alcool isobutylique. De même indépendamment de la teneur en valine, on note une formation constante d'alcool isoamylique. Pour les faibles teneurs en valine, la formation d'alcool isoamylique est même supérieure à celle d'alcool isobutylique. On a donc ici encore la preuve d'une formation de ces alcools par un processus différent de la réaction d'EHRLICH. La constance des teneurs quand le taux de l'aminoacide non correspondant s'accroît, suggère un mécanisme de formation sans relation avec l'assimilation azotée.

Bilan d'utilisation de la leucine, de l'isoleucine et de la valine pour le moût de raisin

Dans cet essai on a suivi parallèlement, au cours de la fermentation d'un moût de raisin (192 g de sucre par litre), la consommation de leucine, d'isoleucine et de valine et la formation des alcools supérieurs, en présence ou non de sulfate d'ammonium. La fermentation se poursuit à 25°C sous l'action d'une souche de *Saccharomyces ellipsoideus*. On procède à des déterminations, très rapprochées au début de la fermentation, du sucre fermenté, de l'ammoniaque restant, des alcools isoamylique et isobutylique par colorimétrie, de la leucine, de l'isoleucine et de la valine par voie microbiologique. Le tableau 3 rassemble les résultats analytiques. Ils permettent de tirer les conclusions suivantes.

TABLEAU 3

Bilans de la formation des alcools supérieurs

Fermentation d'un moût de raisin.
Teneurs des aminoacides et des alcools supérieurs en mg par litre.

	Temps en heures	Alcool formé	NH_4	Alcools supérieurs			Leucine	Isoleucine	Valine	Al. isoamylique correspondant aux leucines	Al. isobutylique correspondant à valine
				Totaux	Isoamylique	Isobutylique					
Moût naturel	0	—	67	—	—	—	9,0	19,5	30	—	—
	24	0°3	53	90	79	11	7,7	16,0	26	3	3
	30	0°9	24	105	95	10	2,2	7,0	16	13	9
	48	4°2	8	155	135	20	1,2	3,0	12	16	11
	72	9°0	10	210	160	50	0,8	1,5	5	17	16
	240	11°4	10	210	160	50	6,3	5,5	7	—	—
Moût + NH_4	0	—	263	—	—	—	9,0	19,5	30	—	—
	24	0°3	242	47	39	8	5,1	16,5	26	5	2
	30	1°0	224	73	58	15	2,1	9,5	11	11	12
	48	4°6	112	160	138	22	1,2	3,0	4	16	16
	72	9°3	70	162	130	32	1,2	1,5	4	17	16
	240	11°3	60	160	135	25	5,7	9,5	9	—	—
Moût aminoacides +	0	—	67	—	—	—	360	700	360	—	—
	24	0°3	53	115	91	24	295	600	330	110	19
	30	0°9	20	143	121	22	230	475	290	238	43
	48	4°2	7	300	258	42	172	310	220	385	87
	72	9°0	10	307	240	67	101	193	170	510	118
	240	11°6	18	307	240	67	115	180	190	—	—

Dans le cas du moût de raisin naturel, sans enrichissement azoté, les courbes de formation des alcools supérieurs ont les formes habituelles précédemment décrites. L'allure de l'assimilation azotée confirme ce que l'on sait de ces phénomènes : les consommations d'ammoniaque, de leucine, d'isoleucine, de valine sont très rapides au début, dans les premières heures et l'utilisation est presque complète au troisième jour ; par la suite on note une légère excrétion, provoquée peut-être par un début d'autolyse.

Le fait important est qu'il n'existe à aucun moment de rapport entre l'alcool isoamylique formé et les leucines consommées, ni entre l'alcool isobutylique apparu et la valine utilisée. La réaction

d'EHRLICH à partir des leucines libres du moût, et en admettant que toute la quantité utilisée subissent cette transformation, peut seulement expliquer le dixième de l'alcool isoamylique présent. Appliquée à la valine, cette même réaction ne rend compte que d'un tiers de la production d'alcool isobutylique. On a donc ici, de nouveau, la preuve que la formation des alcools supérieurs dans un milieu naturel dépasse de beaucoup les possibilités de la réaction d'EHRLICH.

Dans le cas du moût fortement enrichi en ammoniaque (+ 196 mg par litre) la formation des alcools supérieurs est à tout moment inférieure à celle du moût témoin, à peu près de 30 p. 100. Cette diminution se retrouve pour les deux alcools. L'assimilation d'ammoniaque a atteint 200 mg par litre ; celle des trois aminoacides dosés n'a aucunement été modifiée par la présence d'ammoniaque ; les courbes d'utilisation sont pratiquement superposables à celles du cas précédent.

La présence d'azote ammoniacal a donc diminué le taux des alcools supérieurs sans modifier l'assimilation des leucines et de la valine libres. Généralement on attribuait le rôle dépressif de l'ammoniaque à une inhibition de la réaction d'EHRLICH, par diminution de l'assimilation des aminoacides. Cette explication ne paraît pas valable. Il est possible que l'ammoniaque à forte dose, en enrichissant les levures en azote, leur permette de synthétiser mieux les enzymes de l'utilisation des alcools supérieurs ; ces derniers, on le verra, apparaissent en effet surtout dans des conditions de carence diastasique.

Dans le moût de raisin enrichi en aminoacides les levures ont consommé par litre, 259 mg de leucine, 507 mg d'isoleucine et 190 mg de valine, au lieu, respectivement, de 8, 16 et 25 mg dans le moût naturel. Les levures sont donc capables d'utiliser des quantités de ces aminoacides considérablement supérieures à celles qui existent normalement dans les moûts. A fortes doses, elles assimilent plus facilement la leucine et surtout l'isoleucine que la valine.

La formation d'alcools supérieurs est nettement plus élevée, 307 mg par litre au lieu de 210 mg pour la dose totale, l'augmentation portant à la fois sur l'alcool isoamylique et sur l'alcool isobutylique. 97 mg d'alcools supérieurs supplémentaires proviennent de l'utilisation supplémentaire de 907 mg d'aminoacides. Le rendement de la réaction d'EHRLICH a donc été très faible. On aurait pu attendre des 766 mg de leucine et des 190 mg de valine assimilées en plus un excédent de formation de 510 mg d'alcool isoamylique et de 120 mg d'alcool isobutylique. A peine le sixième du taux des aminoacides utilisés a subi la réaction d'EHRLICH. On peut même penser que ce mode de formation est pratiquement négligeable dans le cas des moûts naturels normaux.

Par addition avant fermentation d'acide glutamique (100 mg par litre), d'acide aspartique (100 mg) et d'isoleucine (200 mg), COLAGRANDE (1958) avait observé une augmentation du taux d'alcools supérieurs allant de 43 à 74 mg par litre environ.

II. — INFLUENCE DES CONDITIONS DE LA FERMENTATION SUR LA FORMATION DES ALCOOLS SUPÉRIEURS

Formation avec divers genres et espèces de levures

Deux séries d'essais ont été mises en œuvre pour dégager l'influence de la nature des levures sur la formation des alcools supérieurs. Dans un premier essai, des levures appartenant à des genres et espèces différents font fermenter le même moût de raisin avec et sans addition de 200 mg de leucine par litre. Dans un second essai, on compare dans le cadre de l'espèce, la formation d'alcools supérieurs par différentes souches. Les tableaux 4 et 5 reproduisent les résultats expérimentaux.

TABLEAU 4

Formation d'alcools supérieurs par différents genres et espèces de levures

Fermentation d'un même moût de raisin.
Taux d'alcools supérieurs en mg par litre.

	Témoin	+ 200 mg de leucine
Saccharomyces ellipsoideus	375	422
Saccharomyces oviformis	285	357
Saccharomyces acidifaciens	202	215
Saccharomyces chevalieri	270	320
Saccharomyces elegans	125	170
Saccharomyces rosei	110	97
Torulopsis bacillaris	137	135
Kloeckera apiculata	70	70
Brettanomyces schanderlii	70	110

TABLEAU 5

Formation d'alcools supérieurs par différentes souches de la même espèce de levures

Fermentation d'un même moût de raisin.
Taux d'alcools supérieurs en mg par litre relevés sur cinq souches de chaque espèce.

	Alcools supérieurs	Alcool isoamylique	Alcool isobutylique
Saccharomyces ellipsoideus :			
Minimum	87	56	31
Maximum	182	134	66
Saccharomyces chevalieri :			
Minimum	80	51	29
Maximum	222	139	83
Saccharomyces oviformis :			
Minimum	125	87	27
Maximum	300	195	105
Saccharomyces acidifaciens :			
Minimum	80	59	21
Maximum	197	140	57
Souches de 10 espèces de levures :			
Minimum	37	30	7
Maximum	300	195	105

Suivant leur nature, les levures forment des quantités très variées d'alcools supérieurs. On peut mieux les comparer à degré alcoolique égal, en calculant le taux des alcools supérieurs pour un milieu à 10° d'alcool, et bien que la proportionnalité au taux d'alcool ne soit qu'approximative. On voit alors que la formation varie de 83 à 353 mg par litre, soit de 1 à 4. Ce sont les *Saccharomyces* courants qui en donnent le plus. Les levures non sporogènes, telles les *Torulopsis*, les *Kloeckera*, les *Brettanomyces* en forment des quantités très faibles. On trouve d'ailleurs des écarts semblables d'une espèce à une autre, dans la formation des autres produits secondaires de la fermentation. On peut les expliquer encore par des différences dans l'alimentation azotée que mettent précisément en évidence les résultats de l'essai relatif à l'addition de leucine. L'introduction de 200 mg par litre de leucine dans le moût provoque une augmentation des alcools supérieurs sensible avec *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces oviformis*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces elegans*, *Brettanomyces schanderlii*. Par contre l'influence est nulle pour *Saccharomyces acidifaciens*, *Saccharomyces rosei*, *Torulopsis bacillaris*, *Kloeckera apiculata*, soit parce que ces levures n'assimilent pas la leucine, soit parce qu'elle ne l'assimilent pas selon le schéma d'EHRLICH.

Le tableau 5 montre que, dans le cadre d'une même espèce, il y a des différences considérables dans la production des alcools isoamylique et isobutylique d'une souche à une autre. Certaines souches en forment deux fois plus que d'autres. Ces caractères de la souche sont fixes et se retrouvent dans des essais de fermentation variés, à l'air et à l'abri de l'air. On peut observer finalement autant d'écart entre deux souches d'une même espèce qu'entre des souches d'espèces différentes. Cependant quelques espèces paraissent former systématiquement moins d'alcools supérieurs ; c'est le cas des *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces carlsbergensis*.

Influence de l'aération

Au cours de nos essais, nous avons eu souvent l'occasion de comparer la production d'alcools supérieurs pour une même levure, se développant sur un même milieu, sous divers états d'aération. Beaucoup d'expériences comportaient deux séries parallèles, l'une fermentant en flacons obturés d'un barboteur ou d'un tube effilé, système d'obturation réalisant des conditions strictes d'anaérobiose, l'autre en flacons obturés d'un tampon d'ouate permettant une certaine aération. La figure 1 et le tableau 6 donnent des exemples des résultats obtenus.

TABLEAU 6

Influence de l'aération sur la formation des alcools supérieurs
Valeurs moyennes calculées pour vingt-sept levures différentes.

	Moût n° 1		Moût n° 2	
	Fermentations aérobies (ouate)	Fermentations anaérobies (tube effilé)	Fermentations aérobies (ouate)	Fermentations anaérobies (tube effilé)
Alcools supérieurs totaux :				
Minimum	37	73	42	72
Maximum	300	375	217	325
Moyenne	*150*	*214*	*127*	*161*
Alcool isoamylique :				
Minimum	30	61	37	62
Maximum	195	271	140	238
Moyenne	*99*	*144*	*89*	*126*
Alcool isobutylique :				
Minimum	7	10	5	10
Maximum	105	134	77	95
Moyenne	*53*	*70*	*38*	*50*

A de rares exceptions près la formation d'alcools supérieurs est plus élevée dans les fermentations se poursuivant à l'abri de l'air. Cependant en utilisant une agitation continue dans l'air au cours de la fermentation, GUYMON et *al.*, (1961) ont obtenu une augmentation du taux des alcools supérieurs. L'anaérobiose a semblé ici favoriser davantage la formation d'alcool isoamylique que celle d'alcool isobutylique, comme l'indique l'évolution du rapport de ces deux alcools. Les écarts sont en moyenne de 30 à 40 p. 100 pour la totalité des alcools supérieurs, mais certaines levures en forment jusqu'à trois fois plus en fermentation anaérobie. Les cas où la production est plus faible à l'abri de l'air concernent des fermentations très incomplètes par insuffisance de développement des levures.

Il est intéressant de rapprocher ces observations du fait que certains produits secondaires de la fermentation glycéropyruvique, en particulier l'acide acétique et à un degré moindre les produits acétoïniques, ont également un taux de formation plus élevé à l'abri de l'air (LAFON, 1955). On sait aussi que l'acétaldéhyde libre est toujours plus abondante au cours d'une fermentation anaérobie. Les modifications des teneurs en enzymes avec les conditions d'aération sont certainement responsables des variations dans les taux des produits secondaires ; les levures se multipliant au contact de l'air possèdent un stock enzymatique beaucoup plus abondant que celles qui se développent à l'abri complet de l'oxygène. Il y a une analogie évidente entre l'évolution du taux des alcools supérieurs et celle concernant l'acétaldéhyde et l'acide acétique.

Influence du pH

Si l'on fait fermenter des milieux naturels et des milieux synthétiques tamponnés, après les avoir amenés à différents pH par addition d'acide ou de base, on constate que ces conditions différentes d'acidité influent nettement sur la formation des alcools isoamylique et isobutylique. Le graphique 6 a été tracé d'après les chiffres moyens d'un grand nombre d'essais de fermentation. A pH 2,6 la formation est minimum ; elle augmente jusqu'à 4,5 lorsque le pH s'accroît, puis diminue à pH 5,0. La courbe d'évolution est à peu près la même pour les deux alcools.

Cette influence de l'acidité est importante puisque la formation est deux fois plus abondante à pH 4,5 qu'à pH 2,6. Les différences de pH de l'ordre de celles rencontrées dans les vins influent nettement sur le taux des alcools supérieurs formés. En vinification les teneurs sont plus fortes dans

les vins provenant de moûts peu acides, elles sont plus faibles au-dessous de pH 3,0. Le pH conditionne la formation de la plupart des produits secondaires et son action sur la formation des alcools supérieurs ne permet pas d'en préciser le mécanisme.

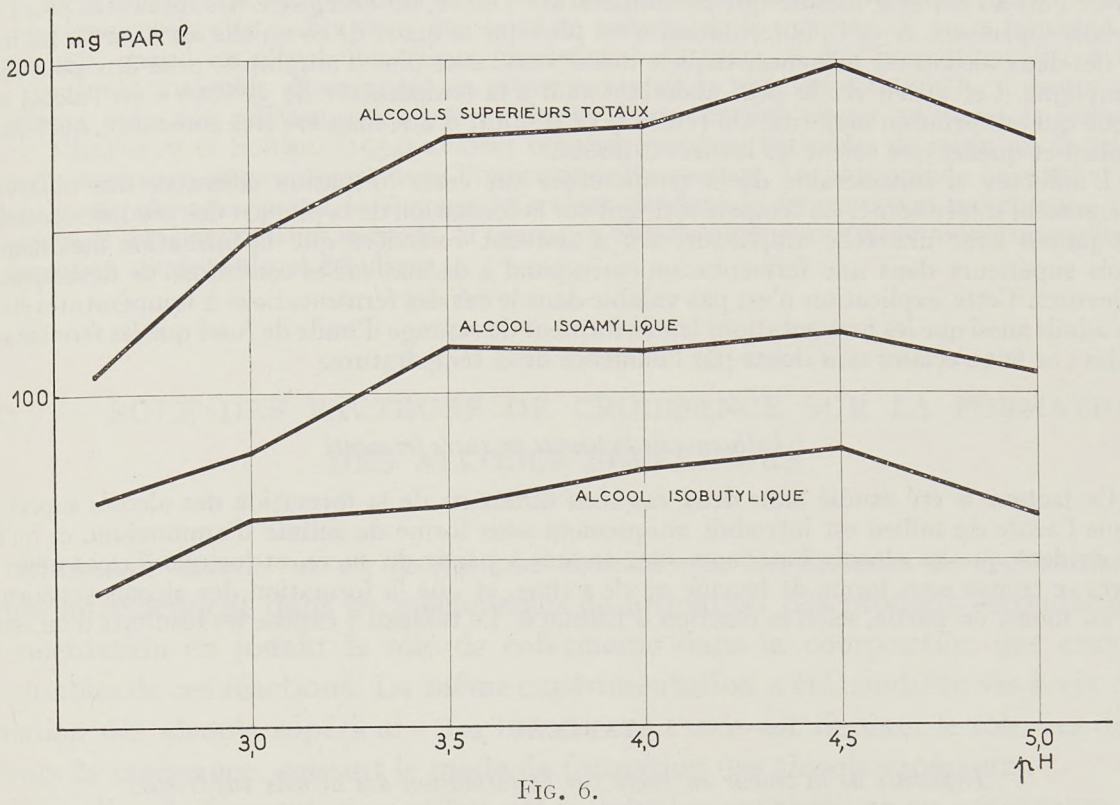


FIG. 6.

Influence de la température

Ce facteur exerce une très grande influence. Nous avons fait fermenter à des températures variées (15°, 20°, 25°, 30° et 35°C) à l'aide de diverses espèces de *Saccharomyces*, des milieux différents :

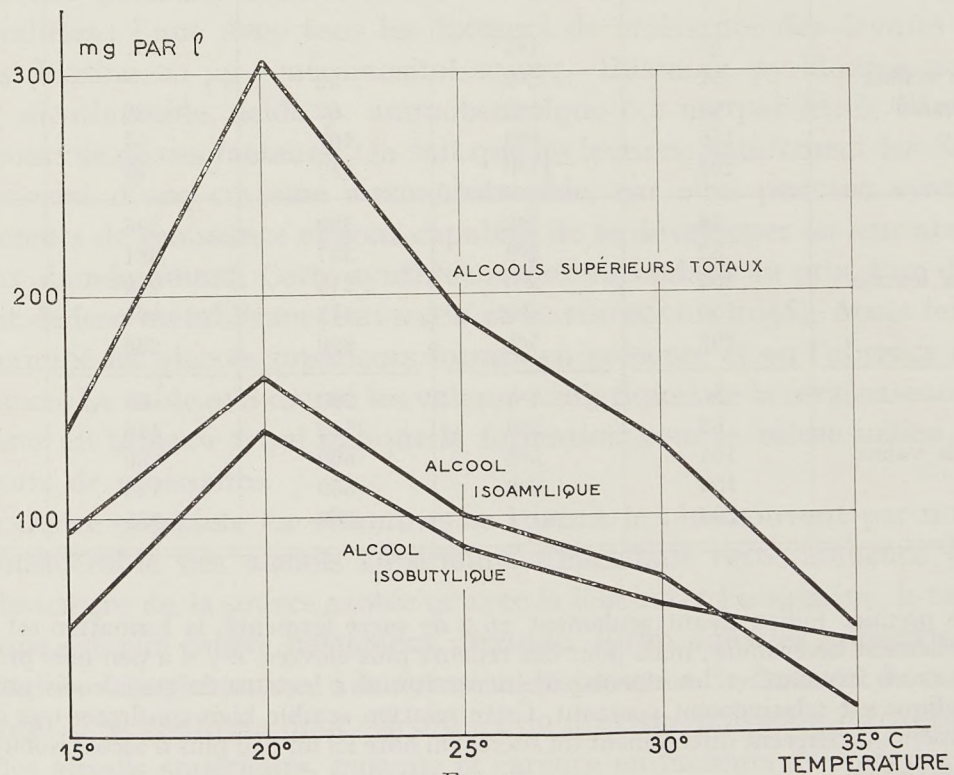


FIG. 7.

moûts de raisin et milieux synthétiques n'ayant pas la même composition azotée. Les graphiques de la figure 7 ont été tracés d'après la moyenne des valeurs expérimentales.

Les alcools supérieurs sont certainement les produits formés au cours de la fermentation qui subissent le plus de variation sous cette influence. La température pour la formation optimum se situe à 20°C. Puis au fur et à mesure que la température s'élève, on enregistre des quantités plus faibles d'alcools supérieurs. A 35°C, la formation n'est plus que le quart de ce qu'elle est à 20°C. La formation des deux alcools est influencée dans le même sens, avec plus d'amplitude peut-être pour l'alcool isoamylique. Cet alcool est le plus abondant sauf à la température de 35°C où c'est l'alcool isobutylique qui est formé en majorité. On retrouve ce résultat d'une manière très constante, quel que soit le milieu et quelles que soient les levures utilisées.

L'influence si considérable de la température sur cette formation constitue une observation extrêmement intéressante. La température agit sur la formation de la plupart des produits secondaires mais jamais avec une telle amplitude. On a souvent considéré que la formation maximum des alcools supérieurs dans une fermentation correspond à de mauvaises conditions de développement des levures. Cette explication n'est pas valable dans le cas des fermentations à températures élevées. On a admis aussi que les fermentations lentes forment davantage d'huile de fusel que les fermentations rapides ; ce fait s'éclaire sans doute par l'influence de la température.

Influence de la teneur en sucre fermenté

Ce facteur a été étudié dans deux cas bien différents de la formation des alcools supérieurs lorsque l'azote du milieu est introduit uniquement sous forme de sulfate d'ammonium, et qu'il est alors évident que les alcools supérieurs sont formés à partir du sucre, et lorsque l'azote offert aux levures se trouve sous forme de leucine ou de valine, et que la formation des alcools supérieurs se fait, au moins en partie, selon la réaction d'EHRLICH. Le tableau 7 expose les résultats d'un essai.

TABLEAU 7

Influence de la teneur en sucre sur la formation des alcools supérieurs

Teneurs en mg par litre. Le sucre est exprimé en g.

	Sucre au départ	Alcool formé	Alcools supérieurs totaux	Alcool isoamylique	Alcool isobutylique
Milieu au sulfate d'ammonium	26	1°4	—	—	—
	52	2°9	32	—	—
	104	5°9	62	20	42
	156	8°9	107	47	60
	208	11°0	117	49	68
Milieu à la leucine	26	1°4	290	286	4
	52	2°9	387	381	6
	104	5°0	245	243	2
	156	6°0	412	404	8
	208	4°4	290	286	4
Milieu à la valine	26	1°4	290	58	232
	52	2°9	512	126	386
	104	5°9	600	150	450
	156	8°9	560	135	425
	208	11°8	560	135	425

Dans le premier milieu ayant seulement 26 g de sucre fermenté, la formation est trop faible pour être facilement déterminée, mais pour des teneurs plus élevées, il y a à peu près proportionnalité entre le sucre fermenté et les alcools supérieurs formés ; le taux de ces alcools ramené à 10° d'alcool éthylique est relativement constant. Cette relation semble bien confirmer que dans ce cas les alcools supérieurs dérivent directement du sucre. On note ici un peu plus d'alcool isobutylique que d'alcool isoamylique.

En présence de leucine ou de valine, le phénomène obéit à une loi différente. Jusqu'à 104 g de sucre, la formation est plus abondante, mais au-dessus le taux n'augmente plus. La réaction d'EHRLICH intervenant ici dans la formation, on comprend que le taux d'alcools supérieurs soit en rapport avec la quantité d'aminoacides assimilés et non directement avec la quantité de sucre. La relation avec le sucre fermenté n'est qu'indirecte, le taux d'aminoacides utilisés dépendant de la durée de l'assimilation azotée, c'est-à-dire dans une certaine mesure, de la quantité de sucre fermenté.

En bref, quand les alcools supérieurs proviennent du sucre, il y a proportionnalité avec le sucre fermenté ; lorsqu'ils proviennent en même temps de la réaction d'EHRLICH, il peut y avoir parallélisme, mais non relation précise, et au-dessus d'une certaine teneur en sucres la formation s'arrête. VILLFORTH et SCHMID (1954) avaient observé que dans les moûts de raisin ou de pomme les alcools supérieurs augmentaient avec l'importance du sucrage. La plus grande quantité d'huile de fusel serait obtenue quand le sucrage intervient pendant la fermentation tumultueuse. Pour ces auteurs, et dans ces milieux naturels, la teneur en alcools supérieurs s'élève proportionnellement à la formation totale d'alcool éthylique.

III. — RÔLE DES FACTEURS DE CROISSANCE SUR LA FORMATION DES ALCOOLS SUPÉRIEURS

RIBÉREAU-GAYON et *al.* (1954) ont montré que les facteurs de croissance des levures interviennent dans les mécanismes de formation des produits secondaires de la fermentation en jouant le rôle de coferments dans la composition des enzymes responsables de ces réactions. La même expérimentation a été conduite vis-à-vis de la formation des alcools supérieurs. Le but de ces essais est de fixer le rôle des divers facteurs de croissance, suivant le mode de formation des alcools supérieurs.

Le milieu de fermentation utilisé est la solution synthétique au saccharose, aux cendres de levures et au phosphate monopotassique, tamponnée au citrate. La source azotée nécessaire aux levures peut être constituée de sulfate d'ammonium ou de divers aminoacides ajoutés individuellement ou en mélange.

Dans une première série d'essais, les fermentations sont conduites en deux séries parallèles ; l'une avec tous les facteurs de croissance des levures aux doses optimales (biotine 20 µg - mésoinositol 10 mg - thiamine, pyridoxine, acide pantothénique, nicotinamide, acide p. aminobenzoïque 0,2 mg par litre), l'autre absolument dépourvue de ces facteurs. On sait que les levures, notamment les *Saccharomyces*, bénéficient d'une certaine auxoautotrophie, car elles peuvent synthétiser les divers facteurs de croissance et sont capables de se développer en leur absence quoique moins abondamment. Cette synthèse se fait cependant au prix d'un déséquilibre important de leur métablisme (PEYNAUD et LAFOURCADE, 1958). Après fermentation on a déterminé les alcools supérieurs formés en présence et en l'absence de facteurs de croissance. Le tableau 8 donne les valeurs analytiques de la série carencée ; on doit le comparer au tableau 1 qui indique la formation pour le même milieu ayant reçu des facteurs de croissance.

La carence complète en vitamines se traduit le plus souvent par une augmentation considérable des alcools supérieurs. Cependant cette influence peut varier suivant la nature de la source azotée et avec la leucine et l'isoleucine, le taux d'alcool isoamylique est par contre nettement diminué. Enfin dans les milieux à l'arginine, à l'asparagine, à la glutamine, à la tyrosine, la présence de facteurs de croissance est indifférente. Il se confirme donc encore ici qu'il existe plusieurs mécanismes de formation des alcools supérieurs, puisque la carence en facteurs de croissance se traduit

TABLEAU 8

Formation d'alcools supérieurs en milieu totalement carencé en facteurs de croissance
Milieu synthétique à 100 g de saccharose par l, exempt de facteurs de croissance.
Alcools supérieurs en mg par litre.

Source azotée	Alcools supérieurs totaux	Alcool isoamylique	Alcool isobutylique
Sulfate d'ammonium	242	59	183
Acide aspartique	97	82	15
Acide glutamique	82	16	66
α-alanine	102	0	102
Arginine	30		
Asparagine	52	33	19
Glutamine	30		
Ornithine	177	75	102
Phénylalanine	115	99	16
Tryptophane	162	79	90
Tyrosine	70	53	17
Asparagine + Sulfate d'ammonium	167	41	126
Cystéine	140	35	105
Cystine	205	39	166
Glycocolle	257	85	172
Histidine	307	106	201
Méthionine	167	77	90
Proline	277	99	178
Sérine	132	85	47
Thréonine	170	153	17
Isoleucine	297	199	98
Leucine	240	230	10
Norleucine	417	300	177
Valine	375	85	290

très différemment suivant la composition azotée des milieux de fermentation. On peut même penser qu'il y a plusieurs mécanismes de formation pour l'alcool isoamylique et plusieurs également pour l'alcool isobutylique.

D'autre part, la facilité de fermentation du sucre montre une relation entre les facteurs de croissance et la nutrition azotée. Tel facteur, inutile dans un milieu à base de tel aminoacide, peut devenir indispensable si cet aminoacide fait défaut. Les vitamines impliquées dans les mécanismes de formation des alcools supérieurs peuvent varier ainsi suivant l'alimentation azotée des levures.

Par ailleurs on observe que généralement les carences affectent fortement l'alcool isobutylique et relativement peu l'alcool isoamylique.

Dans une autre série d'essais, on a étudié avec le même milieu de base, pour les mêmes sources azotées très variées, l'influence des diverses carences vitaminiques. Dans ce but ont été préparées sept solutions nutritives contenant les sept facteurs de croissance importants des levures, sauf l'un d'entre eux, différent chaque fois ; un huitième milieu ayant reçu tous les facteurs de croissance servait de témoin. Le tableau 9 donne le taux des alcools supérieurs formés pendant la fermentation dans ces conditions.

TABLEAU 9

Formation d'alcools supérieurs suivant la carence vitaminique

Milieu synthétique à 100 g de saccharose par litre.
Alcools supérieurs en mg par litre.

Source azotée	Toutes les vitamines	Sans thiamine	Sans biotine	Sans ac. pantothénique	Sans nicotinamide	Sans pyridoxine	Sans mésoinositol	Sans ac. p-aminobenzoïque
Sulfate d'ammonium ..	47	88	100	122	30	40	60	57
Acide glutamique	47	52	40	15	40	52	40	40
α-alanine	37	35	65	150	147	67	70	150
Asparagine	45	30	57	57	37	50	22	20
Ornithine	55	132	80	97	72	55	62	55
Phénylalanine	75	90	115	55	65	100	65	82
Tryptophane	55	92	165	110	55	70	100	60
Tyrosine	77	77	77	40	70	77	70	82
Cystine.....	97	—	117	165	77	117	97	117
Glycocolle	172	235	172	265	177	177	172	177
Méthionine	145	130	107	130	125	175	137	107
Proline	150	175	237	140	165	187	140	145
Sérine	155	132	147	125	140	85	132	140
Thréonine	147	80	180	192	162	140	162	140
Leucine	430	400	340	242	420	430	410	440
Valine	305	315	320	270	295	325	—	320
Caséine hydrolysée ..	362	287	260	150	292	412	152	375

Nous analyserons l'effet de ces diverses carences, une à une. Dans le cas de la leucine et de la valine, la carence en acide pantothénique abaisse nettement le taux des alcools supérieurs. La carence en biotine diminue de même légèrement la formation d'alcool isoamylique à partir de la leucine. L'acide pantothénique est vraisemblablement impliqué dans le mécanisme de la réaction d'EHRLICH à titre de coferment d'un enzyme essentiel.

Cet effet dépressif de la carence pantothénique s'observe encore, quoique plus atténué, lorsque l'acide glutamique, la phénylalanine, la tyrosine, la sérine, la méthionine, la proline, constituent l'aliment azoté des levures. Il en est de même avec le milieu à la caséine hydrolysée (riche surtout précisément en leucine, isoleucine et acide glutamique).

Par contre on assiste à une production beaucoup plus élevée quand l'acide pantothénique manque dans les milieux au sulfate d'ammonium ou dans ceux préparés à base de l'un des aminoacides suivants : α-alanine, asparagine, cystine, glycocolle, ornithine, thréonine, tryptophane. C'est alors surtout l'alcool isobutylique qui est augmenté. L'intervention d'un facteur de croissance fait donc apparaître encore une fois la complexité des phénomènes de formation des alcools supérieurs qui ne s'effectuent pas selon un processus unique.

La carence en biotine augmente également le taux des alcools supérieurs et de l'alcool isobutylique en présence de sulfate d'ammonium, lorsque ce sel est seul ou en mélange avec la caséine ou d'autres aminoacides, et en présence aussi de proline, d'histidine, d'α-alanine, de thréonine, de tryptophane, de phénylalanine.

L'absence de thiamine se traduit dans certains cas par une augmentation, dans d'autres plus rares par une diminution, et le même comportement se retrouve, moins accentué et moins général, pour la nicotinamide, la pyridoxine, le mésoinositol. Par contre l'acide p. aminobenzoïque intervient peu dans ces phénomènes, sauf pour le milieu sans α-alanine, qui en l'absence de ce facteur est beaucoup plus riche en alcools isoamylique et isobutylique.

Reçu pour publication en février 1962

SUMMARY

THE FORMATION OF HIGHER ALCOHOLS BY WINE PRODUCING YEASTS

A review of the bibliography on the production of higher alcohols in alcoholic fermentation is given which describes in broad outline the development of our knowledge of nitrogen assimilation in the yeasts and of the origin of these alcohols. The results of the authors' experiments confirm that EHRLICH's reaction is not the only, or even the chief mechanism of nitrogen assimilation involved, and it is certainly not the principal one for the formation of higher alcohols. Synthesis starting from the sugar molecule is probably the commonest path adopted under normal conditions.

That there are various mechanism operating during alcoholic fermentation is shown by the different forms adopted by the higher alcohol production curves as they become influenced by the conditions of fermentation and the nature and importance of the sources of nitrogen available to the yeasts. From the processing schedules it has been possible to show that the part played by EHRLICH's reaction in the synthesis of isoamyl and isobutyl alcohols is responsible for no more than one-sixth of the rate of leucine, isoleucine and valine assimilation. Thus this particular method of formation is practically negligible in the fermentation of normal grape musts.

The influences caused by the kind of yeast, the aeration, the pH, the temperature and the sugar concentration on the levels of higher alcohol formation have also been studied. It has been found that the production of higher alcohols can vary from 1 to 5 according to the strain of yeast employed; while anaerobic conditions, a pH in the region of 4.5 and a temperature around 20°C are all favourable to the formation of these alcohols.

Finally, a study of the role of growth factors has underlined the importance of pantothenic acid in the phenomena of growth, while the diversity of response to vitamin deficiencies clearly indicates differences in the operative mechanisms.

It may be concluded that higher alcohols may be regarded as products of the metabolism of yeasts formed for the most part as secondary products from the sugar molecules. Certain of the production mechanisms are similar to those operating in nitrogen synthesis, but they are none the less independent. There is only one fraction which is tied to the direct degradation of the amino acids, and that only under certain conditions.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANTONIANI C., CIOFFI R. M., 1948. Dizaminazione e fermentazione alcolica degli aminoacidi. *Annali Chim. applicata*, **38**, 429 ; **38**, 514 ; 1949, **39**, 237 ; 1950, **40**, 421.

ANTONIANI C., FEDERICO L., FLEISCHMANN L., 1957. Identificazione dell'acetore di NH_2 nelle transaminazioni in vivo del Sacch. ellipsoideus. *Bull. Soc. ital. Biol. sperim.*, **33**, 347. Influence des thioaminoacides dans la formation des alcools supérieurs par fermentation. *Chimie et industrie*, **78**, 220.

ANTONIANI C., FEDERICO L., FLEISCHMANN L., TAGLIABUE L., 1957. Sul comportamento fermentativo per opera di Sacch. ellipsoïdeus dell'acido α-amino-*n*-butirrico e dell'acido α-chetobutirrico. *Chimica*, n° 9.

BARTON-WRIGHT E. C., 1951. Some aspects of the nitrogen metabolism of yeast. *J. Inst. Brew.*, **57**, 45.

BARTON-WRIGHT E. C., 1952. An analytical approach to some problems in the nitrogen relations of yeast. *Wallerstein Labor. Comm.*, **15**, 115.

CASTOR J. G. B., GUYMON J. F., 1952. On the mechanism of formation of higher alcohols during alcoholic fermentation. *Science*, **115**, 2980.

COLAGRANDE O., 1958. Amminoacidi dei mosti e produzione di alcoli superiori. *Ann. Facolt. agrar.*, **66**, 141.

CROWELL E. A., GUYMON J. F., INGRAHAM J. L., 1961. Techniques for studying the mechanism of higher alcohol formation by yeasts. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **12**, 111.

EHRLICH F., 1906. Spaltung racemischer Aminosäuren mittels Hefe. *Biochem. Z.*, **1**, 8, 1906. Zur Frage der Fuselölbildung der Hefe. *Berichte D. Chem. Ges.*, **39**, 4072.

EHRLICH F., 1907. Über das naturliche Isomer des Leucins. *Ibid.*, **40**, 2538, 1907. Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zuzammenhang mit dem Eiweissabbau der Hefe. *Berichte D. Chem. Ges.*, **40**, 1027.

EHRLICH F.,1961. Über die Vergärung des Tyrosins zu Tyrosol. *Berichte D. Chem. Ges.*, **44**, 139.

EHRLICH F., 1912. Über Tryptophol ein neues Gärproduckt der Hefe aus Aminosäuren. *Ibid.*, **45**, 889.

GENEVOIS L., 1952. Formation des alcools supérieurs et de leurs dérivés au cours de la fermentation alcoolique. *Ind. agric. alim.*, **69**, 27.

GENEVOIS L., 1954. La synthèse isoprénique des caroténoïdes. *Bull. Soc. Chim.*, **21**, 450.

GENEVOIS L., LAFON M., 1956. Transformation de l'acétate marqué par la levure en fermentation anaérobie : formation d'acide succinique, d'isopropanol, d'alcool amylique et de stérols. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **38**, 89-1957. Origine des huiles de fusel dans la fermentation alcoolique. *Chimie et Industrie*, **78**, 323.

GENEVOIS L., BARAUD J., 1959. Les produits secondaires de la fermentation alcoolique ; la composition des fusels. *Ind. agric. alim.*, **76**, 837.

GENEVOIS L., 1961. Compte rendu du 5e Congrès international de biochimie. *Ind. agric. alim.*, **78**, 1221.

GLIMM E., STENZEL, 1931. *Brauereiwissenschaft*, 49.

GUYMON J. F., INGRAHAM J. L., CROWELL E. A., 1961. Influence of aeration upon the formation of higher alcohols by yeasts. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **12**, 60-66.

INGRAHAM J. L., GUYMON J. F., 1960. The formation of higher aliphatic alcohols by mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Bioch. Biophys.*, **88**, 157.

LAFON M., 1955. Contribution à l'étude de la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique. *Thèse Sciences*, Bordeaux.

NEUBAUER O., FROMHERZ K. ,1911. Über den Abbau der Aminosäuren bei der Hefegärung. *Z. physiol. Chem.*, **70**, 326.

NEUBERG C., HILDESHEIMER A., 1911. Über zuckerfreie Hefegärung. *Biochem. Z.*, **31**, 170.

PEYNAUD E., 1948. Bilans des produits secondaires de la fermentation alcoolique. Différenciation physiologique des levures. *Ind. agric. alim.*, **65**, 99.

PEYNAUD E., LAFON M., 1952. Bilans des produits secondaires de la fermentation alcoolique pour divers genres de levures et dans des conditions différentes d'aération. *Ind. Agric. alim.*, **69**, 397.

PEYNAUD E., GUIMBERTEAU G., 1958. Sur la teneur des vins en alcools supérieurs. Estimation séparée des alcools isobutylique et isoamylique. *Ann. Falsif. Fraudes*, **51**, 70.

PEYNAUD E., LAFOURCADE S., 1958. Les équilibres vitaminiques chez les levures. *Ann. Inst. Pasteur*, **94**, 78.

PEYNAUD E., GUIMBERTEAU G., 1959. Mécanismes de la formation des alcools supérieurs au cours de la fermentation alcoolique. *C. R. Acad. Sci.*, **248**, 868.

RIBÉREAU -GAYON J., PEYNAUD E., LAFON M., 1954. Facteurs de croissance et produits secondaires de la fermentation alcoolique. *C. R. Acad. Sci.*, **239**, 1549.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., LAFON M., 1955. Recherches sur la genèse des produits secondaires de la fermentation alcoolique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **37**, 457.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1959. Acides aminés des moûts et alcools supérieurs des vins. 84e Congrès des Sociétés savantes, Dijon.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1960. *Traité d'œnologie*. Béranger, Paris, Tome II, pp. 350 et 431.

STICKLAND L. H., 1934. Studies in the metabolism of the strict anaerobies (Genus Clostridium). *Biochem. J.* **28**, 1746.

THORNE R. S. W., 1949. The nitrogen nutrition of yeast. *J. Inst. Brewing*, **55**, 201.

THORNE R. S. W., 1950. Mechanisms of nitrogen assimilation by yeast and their relation to the problem of yeast growth in wort. *Wallerstein Labor. Comm.*, **13**, 319.

THOUKIS G., 1958. The mechanism of isoamyl alcohol formation using tracer techniques. *Amer. J. of Enology*, **9**, 161.

VILLFORTH F., SCHMID W., 1954. Uber höhere Alkohole im Wein. *Wein-Wissenchaft*, **8**.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (2), 107-119.

DÉTERMINATION DES SUCRES RÉSIDUELS DES VINS, LEUR RELATION AVEC LA FERMENTATION MALOLACTIQUE

DEUXIÈME PARTIE

N. MELAMED

Station de Technologie végétale, Versailles (Seine-et-Oise).

SOMMAIRE

On a cherché à connaître dans quelle mesure les sucres résiduels rencontrés dans les vins secs peuvent être utilisés par les bactéries malolactiques. En travaillant sur milieu artificiel avec deux souches bactériennes différentes, on a montré que le glucose était attaqué de préférence aux autres sucres. L'arabinose peut aussi être utilisé, mais pas le xylose. L'acidité volatile formée provient en grande partie de l'attaque de l'arabinose.

LE COMPORTEMENT DES FERMENTS MALOLACTIQUES VIS-A-VIS DES DIVERS SUCRES

Les résultats obtenus dans la première partie de ce mémoire montrent que les vins ayant effectué leur fermentation malolactique, contiennent moins de sucres réducteurs que les vins ne l'ayant pas faite. On a pu en outre remarquer que pour certains sucres la diminution est plus importante que pour d'autres.

Par les expériences qui vont suivre, nous avons voulu connaître dans quelle mesure les divers sucres trouvés dans le vin peuvent être utilisés par les bactéries malolactiques. Nous avons aussi recherché si ces glucides seuls ou en mélange peuvent favoriser la croissance de ces bactéries. En effet, jusqu'ici plusieurs facteurs qui conditionnent la fermentation malolactique ont retenu l'attention de divers chercheurs, mais aucun d'entre eux n'a envisagé l'influence individuelle des sucres résiduels des vins.

Pour étudier ces nouveaux facteurs, nous avons réalisé deux séries d'expériences complémentaires avec des souches et dans des conditions expérimentales légèrement différentes. Dans chacune d'elles, nous avons suivi la croissance et le métabolisme

des bactéries placées dans des milieux qui différaient uniquement par les sucres ou les mélanges de sucres qu'ils contenaient. Dans une première série d'expérimentations, nous avons utilisé une souche bactérienne identifiée comme *L. arabinosus*, qui nous avait déjà servi au cours d'un travail antérieur. La dégradation des sucres et de l'acide malique s'étant effectuée trop rapidement, nous avons procédé à une deuxième série d'expériences à l'aide d'une autre souche de bactéries isolée d'un vin en fermentation malolactique et dont la croissance est plus lente. De plus, la concentration en sucres de ces dernières expériences se rapproche davantage de celle du vin.

I. — Méthodes analytiques choisies

La plupart des déterminations analytiques de ces deux séries d'expériences telles que : le dosage du glucose, du fructose, de l'acidité totale et de l'acidité volatile, sont faites suivant les méthodes décrites dans la première partie. Quant au dosage des pentoses et à la détermination de l'acide malique, les méthodes que nous allons citer présentent certains avantages par rapport à celles décrites antérieurement.

1. *Dosage global des pentoses*

Comme nous le verrons plus loin, les milieux synthétiques que nous avons préparés contiennent, en ce qui concerne les pentoses, soit de l'arabinose, soit du xylose, soit l'ensemble de ces deux sucres. Le dosage global des pentoses suivant la méthode de Mejbaum (1939) reviendrait pour les deux premiers cas, à la mesure individuelle de l'arabinose ou du xylose puisqu'ils sont seuls présents dans le milieu. En ce qui concerne le troisième cas, les résultats indiquent la somme du xylose et de l'arabinose. Les trois valeurs ainsi obtenues peuvent nous donner une indication sur la relation entre les bactéries étudiées et ces glucides seuls ou en mélange.

La méthode colorimétrique de Mejbaum est basée sur la transformation des pentoses en furfurol sous l'action de l'acide chlorhydrique. Elle consiste à déterminer

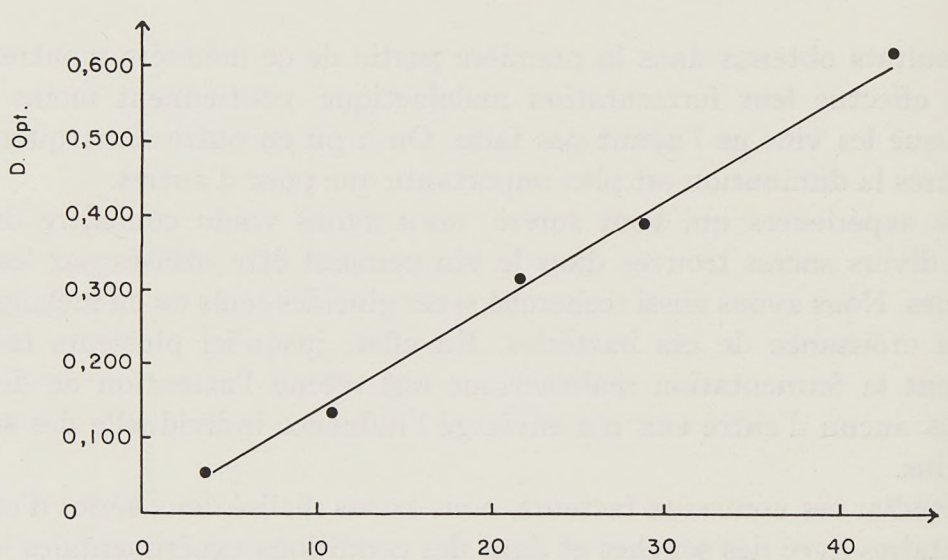


Fig. 23. — Courbe d'étalonnage pour le dosage des pentoses.

l'intensité de la coloration verte que donne le furfurol avec l'orcinol en milieu chlorhydrique. La technique est la suivante :

Dans un tube à essai nous introduisons 3 ml du milieu convenablement dilué pour contenir entre 10 et 50 γ de pentoses. Nous y ajoutons 3 ml de la solution de MEJBAUM préparée extemporanément. Cette solution est composée de 1 p. 100 d'orcinol dans l'acide chlorhydrique concentré contenant 0,1 p. 100 de chlorure ferrique. Les tubes sont ensuite plongés dans un bain-marie bouillant, pendant 30 minutes. On les refroidit immédiatement et on mesure l'intensité de la coloration produite dans les tubes de 1 cm d'épaisseur avec le filtre 660 mμ. Un essai à blanc est nécessaire.

La figure 23 établie à partir de quantités connues d'arabinose (on pouvait indifféremment choisir un autre pentose) permettra de connaître la teneur en pentoses dans les solutions après action microbienne.

2. *Dosage de l'acide l-malique*

La méthode de la détermination qualitative de l'acide malique décrite dans la première partie n'est pas applicable dans les milieux artificiels que nous avons préparés avec de l'acide dl-malique, par raison d'économie. Cela pour deux raisons : la technique chromatographique de CHEFTEL, MUNIER et MACHEBŒUF (1951) ne permet pas la séparation de l'acide l-malique de son isomère l'acide d-malique. De plus les bactéries lactiques n'utilisent que de l'acide l-malique. Nous avons donc été amené à doser l'acide l-malique en utilisant une méthode enzymatique pouvant nous fournir la spécificité recherchée. Nous avons employé celle qui consiste à mesurer dans un micromanomètre de WARBURG le gaz carbonique provenant de la décarboxylation de l'acide l-malique par une enzyme adaptative de *L. arabinosus*. Comme on a pu le vérifier cette enzyme est extrêmement spécifique pour le dosage de l'acide l-malique ; elle n'attaque pas l'acide d-malique.

Cette méthode de dosage avait été récemment appliquée aux vins par ROSSET et DUPUY (1958) et nous avons, suivant les conditions recommandées par ces auteurs, opéré de la manière suivante :

Nous plaçons dans la cupule de l'appareil de WARBURG 1 ml de tampon acétate à pH 4,8 (40 ml acide acétique 0,2 M ; 60 ml acétate de soude 0,2 M ; 0,4 g glucose ; 0,08 g Cl_2Mn, 4 H_2O) et 0,5 ml de suspension bactérienne. Dans le diverticule nous introduisons 0,5 ml de l'échantillon ramené à pH 5 par une solution de soude 5 N. Les fioles adaptées à leur baromètre sont introduites dans un bain thermostatique à 38°. Avant de faire réagir les bactéries sur l'acide malique, l'atmosphère est remplacée à l'intérieur des fioles par un mélange de N_2 95 p. 100 et CO_2 5 p. 100. Cette opération a pour but de supprimer entièrement la respiration des bactéries.

Lorsque la température des fioles est équilibrée, on ferme le manomètre et on mélange le contenu des fioles. On fait la mesure du gaz carbonique dégagé au bout de 45 minutes. 1 μl de gaz carbonique dégagé correspond sensiblement à 6 γ d'acide l-malique.

3. *Mesure de croissance des bactéries lactiques*

Basée sur le principe de l'opacité des suspensions, la croissance est mesurée dans des tubes calibrés de 18 × 180 mm avec un colorimètre LUMETRON, modèle 402 E,

en utilisant le filtre 575 mμ. Les résultats obtenus en densité optique peuvent traduire en poids sec de bactéries par l'intermédiaire d'un diagramme établi commes

On ensemence le milieu nutritif avec les bactéries étudiées. On met à incu à l'étuve à la température optima des microorganismes (25-30°). Quand la croissa est suffisante, on récolte ceux-ci par centrifugation. On en fait une suspension base sur laquelle on détermine l'extrait sec. A partir de cette suspension on étab par dilution, une gamme d'échantillons de concentration croissante, allant de 0 mg/l d'extrait sec. On mesure la densité optique de chacune de ces solutions, et trace enfin la courbe correspondante.

La mesure de l'opacité des suspensions peut s'effectuer avec n'importe leq des appareils utilisés pour les solutions colorées, en se souvenant que les densi mesurées peuvent changer beaucoup suivant l'ouverture du faisceau, l'épaisseur de solution, la distance cuve-récepteur, et la dimension des matériaux en suspension. Po un même appareil et les mêmes microorganismes, ces facteurs doivent resterconstan

Il y a lieu de remarquer en outre que les opacités des solutions ne sont propo tionnelles au poids sec des microorganismes que dans une zone de densité optiq donnée. Cette zone est variable avec l'appareil utilisé. Pour notre colorimètre cet zone correspond aux valeurs de densité optique supérieures à 0,5.

On peut admettre que dans nos conditions de manipulation, une densité optiq de 0,55 correspond à environ 1 mg par litre de bactéries en poids sec.

4. *Isolement d'une souche de bactéries malolactiques*

La 1e série d'expériences a été conduite avec *Lactobacillus arabinosus* de la souch LA_1 fournie par la Station de Technologie végétale de l'I. N. R. A. à Versailles.

La 2e série d'expériences a été conduite avec une souche bactérienne que nou avons isolée du vin en fermentation malolactique de la façon suivante :

Lorsqu'on part d'un vin riche en levures, il convient d'en éliminer d'abord la plu grande partie par une centrifugation de 5 minutes à 2 000 × g. On s'assure, par exame microscopique, que le liquide surnageant contient plus de bactéries que de levures. On effectue alors des dilutions de 10 en 10 qui serviront à ensemencer le milieu suivant : ju de raisin blanc stérilisé : 1 volume ; milieu d'Ochoa (1952) décrit plus loin : 1 volume gélose double : 2 volumes. Ce milieu étant acide, il empêchera le développement des micro organismes sporulés qui sont des contaminations banales du vin. Il est impossible d préparer directement un milieu gélosé de pH inférieur à 5, car la gélose perd son pouvoi gélifiant après la stérilisation par chauffage en milieu acide. Cet inconvénient ne se pro duit pas quand on utilise la gélose double, c'est la raison pour laquelle nous l'avons choisie

Pour obtenir des colonies pures de bactéries, on coule dans les boîtes de Petri le jus de raisin et le milieu d'Ochoa. On ajoute ensuite quelques gouttes de vin dilué, et on solidifie par de la gélose double. Les boîtes sont mises à l'étuve à 25° et les colonies sont examinées après une ou deux semaines d'incubation. Dans les boîtes de Petri cor respondant à une dilution convenable, il apparaît alors des colonies isolées, très petites et à peine perceptibles à l'œil. Il est cependant possible de les reprendre avec le mor ceau de gélose qui les entoure et de les transporter directement dans un milieu liquide aux fins de multiplication.

On a utilisé le milieu d'Ochoa contenant par litre :

glucose, 20 g ; acide dl-malique, 27 g ; yeast extract « DIFCO », 10 g ; beef extract « DIFCO », 3 g ; bactotryptone « DIFCO », 5 g ; acétate de sodium, 3 H_2O, 10 g ; phos

phate monopotassique, 1 g ; de solution de WRIGHT et SKEGGS (1944) 5 ml (SO_4Mg, $7H_2O$, 40 g ; SO_4Mn, 4 H_2O 2 g ; Cl_3Fe anhydre, 0,4 g ; ClH concentré, 20 gouttes ; eau, q. s. pour 1 litre). Le pH est ajusté à 4,2.

2. — EXPÉRIMENTATION

Première série d'expériences

Le milieu de base choisi pour cette expérience est dérivé de celui déjà utilisé par OCHOA (1952) pour la croissance de *L. arabinosus*. La principale différence provient du pH que nous avons ajusté à 3,5 au lieu de 4,2 pour nous rapprocher des conditions réalisées dans le vin. Les divers sucres ont été ajoutés ensuite en employant des solutions stériles.

La composition du milieu de base est la suivante :

acide dl-malique 26,6 g ; yeast extract « Difco » 10 g ; Beef extract « Difco » 5 g ; Acétate de soude, 3 H_2O10 g ; Phosphate monopotassique 1 g ; Bactotryptone 3 g ; Biotine 10 γ ; Solution saline WRIGHT et SKEGGS 5 ml ; Eau q. s. pour 1 litre.

Le pH est ajusté à 3,5 avec de l'acide chlorhydrique.

Ce milieu est ensuite chauffé à l'autoclave pendant 20 minute à 120°. Ceci provoque une diminution de volume et l'apparition d'un trouble protidique gênant la mesure de la croissance des bactéries qui doit être déterminée ultérieurement par turdibimétrie. Nous éliminons le trouble formé par filtration. Le milieu est alors réparti en fractions de 100 ml puis stérilisé 15 minutes à 110°.

Une analyse préliminaire de ce milieu montre l'existence de 220 mg/l de fructose et de 340 mg/l de pentose.

Les solutions sucrées à 10 p. 100 de D (+) glucose, D (—) fructose, L (+) arabinose et D (+) xylose sont préparées séparément et stérilisées par trois chauffages successifs de 30 minutes à 100°. Pour ne pas changer la concentration de ces solutions nous ramenons les fioles à leur poids initial avec de l'eau stérile.

Conduite de l'expérience

Dans une série de 11 fioles de 250 ml nous répartissons stérilement 100 ml du milieu de base. Nous y ajoutons les solutions sucrées, et les ensemençons avec la souche *L. arabinosus* selon les indications du tableau 24. Ces milieux sont ensuite incubés à l'étuve à 25°.

TABLEAU 24

Répartition des solutions sucrées sur le milieu de base.

Fioles n°	Milieu de base ml	Glucose 10 % ml	Fructose 10% ml	Arabinose 10% ml	Xylose 10% ml	L. arabinosus ml	Eau stérile ml
T_1.....	100	—	—	—	—	—	10
T_2.....	»	—	—	—	—	0,5	9,5
1.....	»	2	—	—	—	»	7,5
2.....	»	—	2	—	—	»	7,5
3.....	»	—	—	2	—	»	7,5
4.....	»	—	—	—	2	»	7,5
5.....	»	2	—	2	—	»	5,5
6.....	»	—	2	2	—	»	5,5
7.....	»	2	—	—	2	»	5,5
8.....	»	—	2	—	2	»	5,5
9.....	»	2	2	2	2	»	1,5

TABLEAU 25

1re *série d'expériences : Développement du « L. arabinosus LA_1 » en présence de divers sucres. Résultats obtenus après 4 jours d'incubation.*

	Augmentation du pH	Augmentation de la d. o. pour une épaisseur de 1 cm et pour une longueur d'onde de 575 mμ	Diminution d'acidité totale meq/l	Augmentation d'acidité volatile meq/l	Diminution du glucose mg/l	Diminution du fructose mg/l	Diminution des pentoses mg/l	Diminution d'acidité malique meq/l
Témoin	0	0	0	0	0	0	0	0
Témoin ensemencé	0,06	0,079	24,1	2,3	0	50	131	29,2
Glucose	0,16	0,337	77,3	4,6	1 820	—	—	168,5
Fructose	0,17	0,310	78,7	2,9	—	1 960	—	168
Arabinose	0,19	0,350	76,7	11,1	—	—	1 677	168
Xylose	0,10	0,106	63,4	2,3	—	—	419	114
Arabinose + glucose..	0,10	0,466	64,0	6,0	1 820	—	1 861	170
Arabinose + fructose..	0,10	0,416	70,9	6,5	—	1 720	1 704	171
Xylose + glucose	0,17	0,336	82,9	2,9	1 820	—	215	169
Xylose + fructose..	0,15	0,295	78,5	2,3	—	1 830	248	168
Glucose + fructose + arabinose + xylose	0,20	0,582	45,0	6,0	1 820	1 760	1 943	171

Résultats

Après 4 jours d'incubation à 25° il ne restait plus de glucose dans le milieu. Pour stopper le développement, les échantillons ont été congelés et soumis immédiatement à l'analyse chimique. La différence de ces valeurs avec les déterminations faites sur le même milieu stérile, fait l'objet du tableau 25.

En examinant ce tableau on constate que nos milieux artificiels ont subi un processus analogue à la fermentation et que l'acide malique a disparu. Le processus à peine visible dans le témoin apparaît favorisé par la présence de divers sucres seuls ou en mélange.

Comme dans cette expérience le développement microbien a été trop rapide pour pouvoir comparer les vitesses d'évolution de chaque échantillon, nous avons refait une deuxième série d'expériences dans des conditions moins favorables à la croissance bactérienne.

Deuxième série d'expériences
(avec une souche isolée du vin).

Le milieu de base utilisée pour cette expérience est beaucoup moins riche en matières nutritives que le précédent. Il contient dans un litre : 6 g acide dl-malique, 15 g yeast extract « Difco », 2,5 g bactotryptone « Difco », 1 g acétate de soude cristalisé, 0,5 g phosphate dipotassique, 2,5 ml de solution de WRIHGT et SKEGGS, 0,1 ml « Tween 80 », 1 ml de biotine à 10 mg par litre.

Le pH est ajusté à 3,5 avec de l'acide chlorhydrique.

Ce milieu nous a permis d'obtenir une croissance beaucoup plus lente que celle des premières expériences et de nous rapprocher davantage des conditions réalisées dans le vin.

La préparation des milieux de culture est faite en suivant le tableau 26, et la suite des opérations ne diffère pas de celle décrite pour les premières expériences.

La souche utilisée ne donne lieu à une croissance nette que dans un milieu additionné de 1 p. 100 de jus de tomate, ainsi que l'a signalé BIDAN (1956).

TABLEAU 26

Répartition des solutions sucrées sur le milieu de base.

Fioles n°	Milieu de base ml	Glucose 10 % ml	Fructose 10 % ml	Arabinose 10 % ml	Xylose 10 % ml	Jus de tomate ml	Souche de bactéries ml
1	200	—	—	—	—	2	1
2	«	2	—	—	—	«	«
3	«	—	2	—	—	«	«
4	«	—	—	2	—	«	«
5	«	—	—	—	2	«	«
6	«	1	1	1	1	«	«

Des prélèvements ont été réalisés après 2, 3, 6 et 7 jours de culture. Les analyses effectuées nous permettent ainsi de suivre l'évolution des divers sucres pendant le développement de la culture. Dans le tableau 27, nous avons indiqué les variations (augmentation ou diminution) que nous avons constatées par rapport au témoin non ensemencé.

TABLEAU 27

2e *série d'expériences : développement d'une bactérie malolactique « souche* 13 » *en présence de divers sucres. Résultats obtenus après* 2, 3, 6 et 7 *jours.*

	Jours	Augmentation de la densité optique	Diminution d'acide malique en meq/l	Diminution des divers sucres dans les cultures en mg/l	
	0		—		
	2	0	—	—	
Milieu de base	3	0,032	—	—	
	6	0,086	—	—	
	7	0,090		—	
	0		0		
	2	0,004	6,0	—	
Glucose	3	0,026	29,9	—	
	6	0,136	44,2	—	
	7	0,136		—	
	0		0		
	2	0,008	9,0	0	
Fructose	3	0,038	39,8	50	
	6	0,094	42,3	200	
	7	0,094		225	
	0		0		
	2	0,012	6,0	0	
Arabinose	3	0,034	26,4	30	
	6	0,162	43,3	334	
	7	0,202		505	
	0		0		
	2	0,004	9,0	0	
Xylose	3	0,028	31,4	5	
	6	0,078	42,3	5	
	7	0,080		35	
				Diminution respective	
				du fructose	des pentoses
Fructose + xylose + arabinose	0		0		
	2	0	10,5	0	55
	3	0,032	26,9	50	85
	6	0,172	44,1	149	110
	7	0,172		199	200

3. — Discussion des résultats

L'examen des résultats obtenus dans ces deux séries d'expériences permet d'arriver aux conclusions suivantes :

1° Les préférences que montrent les deux souches vis-à-vis des divers sucres sont les mêmes. On trouve dans l'ordre des développements décroissants : l'arabinose le glucose et le fructose. Le xylose donne un développement qui est à peu près le même que celui du témoin, c'est-à-dire, à peu près nul.

La présence simultanée de glucose et d'arabinose favorise considérablement la croissance.

2° La consommation de l'arabinose est augmentée par la présence de glucose et de fructose. Au contraire la présence des hexoses réduit la disparition du xylose. Réciproquement, l'assimilation du fructose est diminuée surtout en présence d'arabinose.

On voit que le xylose est mal utilisé par ces bactéries qui ne le consomment que lorsqu'elles n'ont pas d'autre sucre à leur disposition. Les trois autres sucres, glucose, fructose et arabinose sont utilisés d'une façon interchangeable. Cependant, dans la deuxième série d'expériences, le fructose a donné un très faible rendement de croissance.

3° La présence, même en faible quantité, de glucides dans le milieu témoin, provoque une décarboxylation de l'acide malique. Le rapport entre l'acide malique dégradé (3 960 mg/l) et les glucides disparus (181 mg/l) est d'environ 20. RADLER en 1958 a donné pour ce rapport le coefficient 10. De toute façon, on remarque par suite des résultats obtenus dans la deuxième série d'expériences, que ce rapport peut varier considérablement d'un sucre à l'autre.

4° Il est curieux de constater qu'au cours de cette fermentation malolactique et en l'absence de toute fermentation alcoolique, la diminution d'acidité fixe est accompagnée d'une augmentation de l'acidité volatile. Sans doute, peut-on rattacher ce résultat à ceux de FRED, PETERSON et ANDERSON (1921) selon lesquels les microbes du type *Lactobacilus* qui fermentent le glucose en acide lactique sont aussi capables de transformer les pentoses en acide lactique et acide acétique selon la relation :

$$C_5H_{10}O_5 \rightarrow CH_3\ CHOH\ CO_2H + CH_3\ COOH$$

Les résultats obtenus dans un milieu de culture artificiel sont à rapprocher des observations que nous avons faites sur les vins. Dans les deux cas, il semble bien que le glucose soit consommé plus rapidement que les autres sucres. Le fructose se comporte comme le glucose, mais doit être moins favorable au développement des bactéries malolactiques, puisque dans le milieu artificiel le rendement de croissance à partir de ce sucre est plus faible.

L'arabinose qui est toujours présent dans les vins secs disparaît partiellement au cours de la fermentation malolactique. Les résultats obtenus au laboratoire montrent en effet que glucose et arabinose peuvent être utilisés en même temps par les ferments malolactiques.

En ce qui concerne le xylose, les expériences de laboratoire montrent qu'avec les souches ensemencées, ce sucre est très mal utilisé. Les résultats obtenus avec les vins de l'Aude confirment cette observation (tableau 22). Les vins d'Alsace se comportent d'une façon différente, en effet, la diminution de xylose paraît importante au cours de la fermentation malolactique. Ceci est peut-être dû au fait qu'il existe aussi des souches capables d'utiliser le xylose. On peut remarquer, en effet, que des quatres souches décrites par BIDAN (1956) et étudiées dans des milieux purement artificiels, deux attaquent fortement le xylose et les deux autres très faiblement.

Nous pensons donc être parvenu à démontrer que les ferments malolactiques se multiplient dans les vins à partir des sucres résiduels. Il n'est cependant pas possible de dire si leur concentration dans les vins peut être un facteur décisif pour le déclenchement de la désacidification biologique.

CONCLUSION

Au cours de ce travail nous avons mis au point une technique nouvelle, pou purifier et concentrer les sucres résiduels des vins secs en cherchant à éliminer autan que possible les causes d'altérations. Cette technique comprend la défécation, la dém néralisation par des échangeurs d'ions, l'élimination des gommes et des pectine et la concentration par la cryodessiccation. Chacune de ces opérations n'avait fa jusqu'ici que l'objet d'études isolées dans des cas particuliers, mais n'avaient jama été coordonnées dans le cadre d'une recherche sur un matériel biologique unique, t que le vin.

Pour séparer les sucres résiduels des vins secs, nous avons utilisé une techniqu chromatographique. Cette technique nous a permis de démontrer que le fructose e l'arabinose sont présents dans tous les vins secs. Le glucose et le xylose ont pu êtr mis en évidence dans 9 échantillons sur 10. Le rhamnose se présente rarement dan les vins. Nous ne l'avons rencontré que dans un seul échantillon. Le saccharose es absent dans tous les vins entièrement fermentés. Nous avons pour la première fo dosé individuellement le glucose dans le vin en utilisant la réaction enzymatiqu rigoureusement spécifique, d'oxydation par la glucose-oxydase. Nous avons trouv que le glucose est présent à une concentration plus importante que le fructose dan la plupart des vins qui n'ont pas effectué la fermentation malolactique.

Nous avons mis au point une méthode colorimétrique pour doser après séparation chromatographique l'arabinose et le xylose. Cette méthode nous a permis de donner des valeurs individuelles pour chacun de ces pentoses, ce qui n'avait jamais été effectué jusqu'à maintenant. Il n'est donc pas correct de considérer que les pentoses dosés dans les vins sont en majorité de l'arabinose.

Nous avons démontré en outre que la teneur en sucres réducteurs des vins dimi nue au cours de la fermentation malolactique.

Cette constatation a été confirmée par des expériences de croissance de bactéries malolactiques faites dans des milieux artificiels. Ces deux faits nous amènent à penser, conformément à notre hypothèse de départ, que ces bactéries utilisent le sucres résiduels du vin pour leur croissance.

Reçu pour publication en mars 196

SUMMARY

DETERMINATION OF RESIDUARY SUGARS IN WINE,
THEIR RELATION WITH MALO-LACTIC FERMENTATION

This study has been undertaken to determine how residuary sugars remaining in the wi after alcoholic fermentation can be utilised by the bacteria fermenting malic acid.

Technique has been elaborated which enables to purify and concentrate residuary sugars co tained in the wine. After defecation, demineralisation and precipitation of the gums and pecti a solution is obtained that can be concentrated and used to identify the sugars by chromatograph and to determine each one separately. The glucose is determined specifically by enzymatic oxidati with glucose oxidase. The fructose is determined colorimetrically by the diphenyl reaction th pentoses xylose and arabinose are estimated after chromatographic séparation on paper and eluti of compounds formed with anisidine.

This technique applied to about thirty samples has shown that fructose is present in all samples, that glucose occurs in 90 p. 100 and sométimes at a rate much higher than fructose. The arabinose is found in a greater amount fhan xylose. Rhamnose has been detected by pap er chromatography, in only one sample.

These results are described and compared with values already shown in the literature. In samples identified before and after fermentation of malic acid, it has been observed that a decrease of sugars took place, especially of glucose and arabinose. In order to confirm this result, experiments have been carried out with a lactobacillus isolated from wine and placed in an artificial medium in the presence of various sugars contained in wine. The most important growth is obtained on glucose and arabinose. The arabinose consumption is increased by the simultaneous presence of glucose. The xylose is poorly utilised. Theamount of acetic acid produced at the expence of arabinose is specially important.

These results lead to the conclusion that the malolactic ferments grow in wines from residuary sugars. How ever, nothing can be said as to whether their concentration in the wine is a decisive factor for the upstart of the biological desacidification.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALFA J., 1933. Analytischer Nachweis der nachträglichen Aufsüssung eines ausgegorenen Weines mit entkeimtem oder stumm gemachtem Most. *Z. Untersuch. Lebensmittel*, **65**, 571-577.

ALLIHN, voir MATHIEU H., 1946. Manuel d'analyse chimique volumétrique. Masson et Cie édit. Paris p. 412.

ALWOOD, 1910. The occurence of sucrose in grapes. *J. Ind. Eng. Chem.*, **2**, 481.

AMTHOR, 1889. *Z. Angew. Chemie.*, **2**, 5.

BABO A. F., MACH E., 1896. Handbuch des Weinbaues und der Kellerwirtschaft. Berlin., **2**, 2.

BERTHELOT, FLEURIEU A., 1864. Sur les proportions comparées d'acide tartrique dans le raisin et dans le vin. *C. R. Acad. Sci.*, **58**, 720.

BIDAN P., 1956. Sur quelques bactéries isolées de la fermentation malolactique. *Ann. Technol. Agric.*, **6**, 613.

BOUSSINGAULT, 1866. *Ann. Chim. Phys.*, **8**, 910.

BROWNE C. A., ZERBAN F. W., 1948. Sugar analysis. John Wiley et Sons, Inc. New-York 3e éd. 414.

BÜCHI W., DEUEL H., 1954. Ueber eine Polysaccharid im Beerensaft von *Vitis] vinifera* L. *Helv. Chem. Acta.*, **37**, 1392-1398.

CHEFTEL R. I., MUNIER R., MACHEBŒUF M., 1951. Microchromatographie de partage sur papier des acides aliphatiques hydrosolubles et non volatils. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 840-845.

CLAVERA J. M., LOPEZ M. O., 1932. Los azucares y el extracto seco en los vinos de Malaga. *Ann. Soc. Espan. Fis. y Quim.*, **30**, 140-144.

COMBONI E., 1896. Presenza e determinazione dei pentosani nell'uva e nei suoi derivati. *Staz Sper. Agrar. Italiane.*, **29**, 815.

CORDEBARD 1939. Le dosage titrimétrique des substances organiques par oxydation chromique. *J. Pharm. Chim.*, 8os., **30**, 263-272.

CSOBAN G., 1950. *Mayar Kém. Folionat.*,, **56**, 446.

DEDONDER R., 1952. Glucides et composés voisins. *Bull. Soc. Chim. France.*, Fas. 1 et 2, 874-883.

DISCHE Z., 1953. Qualitative and quantitative colorimetric determination of heptoses. *J. Biol. Chem.*, **204**, 983.

DUBOURG, 1897. Contribution à l'étude des levures de vin. *Rev. Vit.*, **8**, 467-472.

DUPUY P., MELAMED N., 1959. La croissance de *Lactobacillus arabinosus* dans le jus de raisin : Influence du pH, de l'éthanol et d'un hydrolysat trypsique. 84e *Congr. Soc. Sav.*, Gauthier Villars Édit., Paris. 263-274.

FABRE J. H., 1945. Analyse des vins et interprétation des résultats analytiques. La Typo-litho. Alger. 3e éd.

FELLENBERG, 1912. Untersuchung von Bleiniederschlägen in Wein : Pentose und Methylpentosebestimmungen in trauben und Wein. *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.*, **13**, 123-227.

FLEURY et BOUTOT, 1922. Thèse de doctorat pharmacie. Paris. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **4**, 361.

FRED E. B., PETERSON W. H., ANDERSON J. A., 1921. The characteristics of certain pentose destroying bacteria, especially as concerns their action on arabinose and xylose. *J. Biol. Chem.*, **48**, 385.

GALANTI M., 1958. Influence des éléments minéraux sur la séparation des sucres par chromatographie de partage sur papier. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, n° 1, 265-275.

GARINO-CANINA, 1943. La fermentation de l'acide malique dans la technique œnologique. *Bull. Off. Inter. Vin*, 63-76.

GAROGLIO P. G., BANCHI G. B., 1940. Saccharimetria dei mosti concentrati. *Progr. Vinic. ed cléa*, **16**, 2782-2784.

GAYON et DUBOURG 1890. Sur la fermentation alccoolique du sucre interverti. *C. R. Acad.*, **110**, 365-368.

GENEVOIS, PEYNAUD et RIBEREAU-GAYON, 1949. La fermentation alcoolique des vins blancs de la Gironde. *C. R. Acad. Sci.*, **229**, 479-480.

GIRARD A., voir MATHIEU H., 1946. Manuel d'analyse chimique volumétrique. Masson et Cie Édit. Paris, 412.

GODET C., MARTIN L., 1946. Contribution à la connaissance des vins suisses. *Mitt. Gebiete Lebensm. u. Hyg.*, **37**, 327-342.

GUICHARD C., 1954. Glucides de la vigne. *Revue Bota.*, **61**, 113-117.

HENNIG K., FLINTJE S. M., 1954. Investigation in the paper chromatography of sugar, sugar acids and amino-acids in wine. *Die Weine-Wissenchaft Beihefte deut. Weinbau*, **8**, 121-125, 129-140.

HOUGH, JONES et WADMANN, 1950. *J. Chem. Soc.*, 1702.

HUGGENS, 1955. Contribution à l'étude de la séparation des sucres par chromatographie sur papier. Mémoire de fin d'études. Institut Agronomique de Gembloux, Belgique.

HULME A. C., 1953. An action of strongly basic anion-exchange resine and solutions containing sugars. *Nature*, **171**, 610-611.

JAULMES P., 1951. Analyse des vins. Poulain Édit. Montpellier. 2e éd.

JEANES A., WISE C. S., 1951. Improved technique in paper chromatography of carbohydrates. *Anal. Chem.* **23**, 415-420.

JERMYN M. A., ISHERWOOD F. A., 1949. Improved separation of sugars on the paper partition chromatogram. *Biochem. J.*, **44**, 402-407.

KEILIN D., HARTREE E. F., 1945. Détermination du glucose en présence de pentoses. *Biochem., J.*, **39**, 293.

KIELHOFER E., AMMAN H., 1956. *Wein u. Rebe.*, **38**, 13.

KOCH A., 1897. 16. Deut. Weinb. Cong. Freiburg. p. 40.

KULISCH P., 1888. *Berichte zu Geisenheim.* 76. — 1897. *Weinbau u. Weinhandel.*, **15**, 430.

LOBSTEIN, SCHMITT., 1931. Le vignoble alsacien et ses vins. *Ann Fals. Fraudes.*, **24**, 220-229.

MAGER J., 1947. Studies on the polysaccharides of capsulated yeasts. *Biochem. J.*, **41**, 603.

MALPRESS et MORRISON 1949. Séparation des sucres et des sels minéraux par la pyridine chaude. *Nature*, **164**, 963.

MEJBAUM W., 1939. Uber die Bestimmung kleiner Pentosenmengen insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. *Z. Physical. Chem.*, **258**, 117-120.

MERS, BEAUFAYS et DUVE, 1953. *Biochem. Biophys. Acta*, **11**, 416.

MONTREUIL J., 1957. Les glucides du lait de femme. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, n° 4, 395.

MÜLLER-THURGAU, 1890. Ergebnisse neuer Untersuchungen auf dem Gebiete der Weinbereitung. *Deut. Weinbaukongress, Worms.*, Sept. 1890.

MULLER-THURGAU et OSTERWALDER, 1913. Die Bakterien im Wein und Obstwein und die dadurch verursachten veränderungen. *Zentralblatt f. Bakt.*, II **36**, 129-138.

MÜTTELET C. F., 1930. Les sucres des vins de Porto. *Ann. Fals. Fraudes*, **23**, 205-207.

OCHOA S., 1952. Enzymatic mechanism of carbon dioxide fixation. The enzymes II. Sumner et Myrbäck édit. Acad. Press. N. Y. Part 2., 1023.

PARTRIDGE S. M., 1949. Aniline hydrogen phtalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. *Nature*, **164**, 443.

PARTRIDGE S. M., 1948. Filter-paper partition chromatography of sugars. *Biochem. J.*, **42**, 238-251.

PELLET H., 1916. Sur la destruction totale des pentoses au cours de la fermentation alccoolique. *C. R. Acad. Sci.*, **163**, 274-276.

PEYNAUD E., 1947. Contribution à l'étude biochimique de la maturation du raisin et de la composition des vins. *Ind. Agric. Alim.*, **64**, 87-92.

PEYNAUD E., 1950. Analyse complète de 12 vins de Bordeaux. *Ann. Agron.*, **1**, 252-266.

PEYNAUD E., et DOMERCQ S., 1955. Sur les espèces de levures fermentant sélectivement le fructose. *Ann. Inst. Pasteur*, **89**, 346-351.

PRIDHAM J. B., 1956. Determination of sugars on paper chromatrograms with p-anisidine hydrochloride. *Anal. Chem.*, **28**, 1967.

RADLER F., 1958. Ueber faktoren die das Wachstum der Apfelsäure-abbauenden Bakterien beeinflussen. *Vitis*, **1**, 288-297.

RADLER F., 1958. Die Energiequelle der Apfelsäure abbauenden Bakterien. *Arch. Mikrobiol.*, **30**, 224-230.

RAVENA C., et ZAMORANE M., 1911. Sulla formazione dell'acido cianidrico nella germinazone dei semi. *Gazz. Chim. Ital.*, **2**, 47.

ROSSET R., DUPUY P., 1958. Détermination de l'acide l-malique dans les boïssons fermentées par décarboxylation enzymatique. *Ann. Technol.*, **4**, 441-451.

SCHAFFER et ARBENZ, 1914. Dosage des pentoses et des méthylpentoses dans le vin. *Trav. Chim. alim. Serv. Sanit. Suisse*, 161.

SCURTI F., 1910. La chimica del vino ed i suoi rapporti con la biochimica vegetale. *Staz. Sperim. agr. Italiana*, **43**, 105.

SEBASTIAN V., 1909. Traité pratique de la préparation des vins de luxe. Montpellier, p. 84.

SEIFERT W., 1901. Ueber die Säureabnahme im Wein und den dadei sich vollziehenden Gärungsprozess *Mitt. Gärungsphysiol. Lab. Klosterneuburg*, 25.

SEMICHON L. et FLANZY M., 1926. Recherches sur la défécation des liquides sucrés par les sels mercuriques *Ann. Fals. Fraudes*, **19**, 208-226.

SEMICHON L., et FLANZY M., 1929. Dosage de l'alcool dans les vins et spiritueux par l'emploi du mélange sulfo-chromique. *Ann. Fals. Fraudes*, 139 et 414. 1930, 347.

SHAFFER et HARTMANN, 1921. *J. Biol. Chem.*, **45**, 349.

SISAKIAN N. M., et MARUTIAN S. A., 1948. Sugars in grapes. *Biokhimiia vinodeliia*, **2**, 56-58.

SZABO I., et RAKCSANYI L., 1935. The ratio of dextrose and levulose in the grape, in the must and in the wine. *Magyar ampelol. Evkonyv.*, **9**, 346-361. (voir aussi C. A. **30**, 1507 - 1936).

TAMAKI Y., 1948. Fermentation products of pentoses by wild yeast and similar fungi. *J. Chem. Soc. Japan Ind. Chem. Sect.*, **51**, 118-120.

TARANTOLA C., 1948. Le sostanze riduttrici infermentescibili del vino. *Riv. Vitic. Enol.*, **1**, 44-47.

TARANTOLA C., 1950. Pentosi e pentosani nei vini e bilancio dei carboidrati fermentescibilie infermentescibili *Riv. Viti. Enol. Conegliano*, **8** et **9**, 1-12.

TOLLENS B., 1896. Ueber den Nachweis der Pentosen mittels der Phloroglucin-Salzsäure-Absatz Methode. *Berichte Deut. Chem. Gesells.*, **29**, 1202-1209.

TORRICELLI 1941. A la recherche d'un nouveau procédé pour déceler les vins fraudés. *Mitt. Gebiete. Lebensm Hyg.*, **32**, 211-216.

VON DER HEIDE C., et BURKARD J., 1935. Ueber den Restzucker im Wein. *Zeit. Untersuch. Lebensm.*, **69**, 68-71.

WALLENFELS K., 1950. Ueber einen neuen Nachweis reduzierender Zucker im Papierchromatogramm und dessen quantitative Auswertung. *Naturwissenschaft*, **37**, 491.

WATTIEZ N., et STERNON F., 1942. Éléments de chimie végétale, Masson éd. Paris.

WEIWERS, 1906. Ueber den unvergärbaren Zucker. Dissertation. Aachen 1906.

WITTMANN 1901. *Zeits. Landw. Versuch. Oesterreich.*, **4**, 1937.

WORTMANN J., 1894. Untersuchungen ueber reine Hefen. *Landw. Jahrb.*, **23**, 584.

WRIGHT et SKEGGS, 1944. *Proc. Exptl. Med.*, **56**, 95.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (2), 121-130.

ÉTUDE D'UN LACTOBACILLE HOMOFERMENTATIF ISOLÉ DU VIN

P. BARRE et P. GALZY

avec la collaboration technique de Micheline AZEMA et A. DI NOTO

Station de Technologie agricole, Centre de Recherches agronomiques du Midi, École nationale supérieure agronomique, Montpellier (Hérault).

SOMMAIRE

Une rétrogradation malolactique d'origine bactérienne se produit régulièrement depuis de nombreuses années dans certaines caves du vignoble des sables. Les vins ainsi élaborés présentent toujours une acidité volatile très faible. On pouvait donc espérer isoler à partir de ces vins une bactérie susceptible de donner une fermentation malolactique sans production exagérée d'acides volatils. Ce travail a donc été entrepris. Après avoir décrit la méthode d'isolement et les techniques générales utilisées pour l'étude de la bactérie, nous exposerons en détail un procédé permettant de déterminer la nature de l'acide lactique produit dans les cultures bactériennes. Après discussion on a caractérisé ce lactobacille comme une souche de *Lactobacillus plantarum*.

I. — INTRODUCTION

La fermentation malolactique qui est très recherchée dans certains vignobles nordiques a joué jusqu'à présent un rôle assez secondaire en vinification dans le midi de la France. Cependant, elle se produit régulièrement dans de nombreux celliers du littoral méditerranéen.

Nous avons isolé dans une de ces caves, une bactérie qui s'est révélée être un Lactobacille homofermentatif.

La classification des Lactobacilles homofermentatifs est basée sur quelques propriétés physiologiques dont une des plus importante est la nature de l'acide lactique formé : acide D (—) lactique, acide L (+) lactique ou acide lactique racémique. Il n'existait pas jusqu'à présent de techniques simples permettant de déterminer le pouvoir rotatoire de l'acide lactique formé par fermentation des glucides dans les cultures bactériennes. Nous avons tenté d'utiliser deux techniques nouvelles, l'une par extraction de l'acide lactique au moyen de résines anioniques et examen polarimétrique, l'autre par utilisation de préparations enzymatiques spécifiques.

Étant donné l'importance de ces déterminations pour l'étude des Lactobacilles nous accorderons une place importante à la description de ces deux techniques au cours de l'exposé des méthodes de travail utilisées.

II. — MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

A. — Isolement et purification

L'isolement de la bactérie a été effectué en deux temps.
On a tout d'abord fait des dilutions successives en tube à essais sur le milieu suivant :

Eau	1 000 ml
Yeast extract Difco (extrait de levures)	6 g
Beef extract Difco (extrait de viande)	2 g
Tween 80	0,5 ml
Jus de tomate	50 ml
Mg, Fe et Mn	traces
Acide DL malique	7 g
pH amené à 4 par	CO_3Ca

Au moment de l'utilisation on ajoute dans chaque tube quelques grains de mycostatine. Grâce aux dilutions successives et à l'action de la mycostatine il a été ainsi possible d'éliminer les levures du milieu.

On ensemence ensuite à partir de la dernière dilution des tubes de cultures en gélose profonde; on utilise le milieu précédent glucosé à 10 g/litre et gélosé à 10 g/litre. Il se forme des colonies après quelques jours de culture. On en prélève une à la pipette Pasteur.

B. — Étude et détermination

1. — *Mode de culture*

Les cultures sont faites, sauf indication contraire, en tubes de 18/18 bouchés au coton. Les cultures anaérobies sont placées sous pyrogallate, le tube étant fermé hermétiquement à l'aide d'un bouchon paraffiné.

Les stérilisations sont effectuées à l'autoclave 40 mn à 110°.

Le milieu de conservation est sensiblement le même que le milieu d'isolement :

Yeast d'extract Difco (extrait de levures)	6 g
Beef extract Difco (extrait de viande)	2 g
Tween 80	0,5 ml
Jus de tomate	50 ml
Mg, Fe, et Mn	traces
Glucose	20 g
Eau	1 000 ml
pH	5,8

C'est ce milieu qui est utilisé pour l'étude de la température optimum, de l'action de l'air, du pH, etc.

Les milieux spéciaux servant aux tests de détermination ont été préparés en fonction des directives de la Société des Bactériologistes américains.

Les milieux servant à tester l'attaque des substrats carbonés seront indiqués dans le texte. Il n'a pas été possible d'utiliser comme milieu de base le milieu d'isolement et de conservation qui est trop riche ; on observe en effet, sur ce milieu une croissance extrêmement abondante même en l'absence de substrat carboné.

2. — *Méthodes analytiques*

Les méthodes utilisées ont été décrites dans un travail précédent : Barre et Galzy (1960). Rappelons que les acides fixes ont été mis en évidence par la méthode de Machebœuf (1951) et les

acides volatils par la méthode de JOLIVET (1957). Le mannitol a été recherché par la technique de GAYON et DUBOURG (1901), le gaz carbonique par la méthode de GUERRA (1938). L'éthanol a été dosé par la méthode de FLANZY (1955).

C. — ÉTUDE DU POUVOIR ROTATOIRE DE L'ACIDE LACTIQUE

1. — *Extraction de l'acide lactique par passage sur colonne de résines anioniques*

La bactérie est cultivée sur un milieu relativement simple (Yeast extract Difco 0,5 p. 100, Saccharose 2 p. 100). En fin de croissance, le milieu de culture est décoloré au noir animal et filtré sur terre d'infusoires. Le liquide obtenu, limpide et incolore, est passé sur une colonne de résines anioniques Dowex 1 × 8 (100-200 meshs) sous forme formiate. On passe du liquide sur la colonne jusqu'à saturation complète de la résine. Un rinçage à l'eau distillée permet l'élimination des impuretés. L'élution des acides est effectuée avec une solution d'acide formique à 50 p. 100. Le liquide obtenu est alors concentré sous vide. La déviation du concentré est mesurée à l'aide d'un polarimètre.

La faible concentration en acide lactique du milieu de culture et les pertes difficilement évitables au cours des nombreuses manipulations (particulièrement au cours de la concentration sous vide) obligent à utiliser un très grand volume de culture (10 à 15 litres). L'extraction de l'acide lactique en quantité aussi importante exige l'utilisation d'un gros volume de résine ; il faut effectuer un grand nombre de passages sur les colonnes ce qui rend la manipulation extrêmement longue. C'est pour économiser à la fois du temps et du matériel que nous avons saturé entièrement la résine à chaque passage sur les colonnes. Dans les conditions où nous avons opéré, on extrait l'ensemble des acides du milieu de culture sans effectuer leur séparation ; mais nous savons qu'à part l'acide lactique on ne trouve dans le milieu en quantité notable que de l'acide acétique. Ce dernier ne peut gêner les déterminations ultérieures et disparaît d'ailleurs pratiquement au cours de la concentration sous vide.

Nous n'avons pas observé de déviation de la lumière, au polarimètre pour le concentré obtenu à partir des cultures de la bactérie étudiée. On peut donc penser que l'acide lactique formé était de l'acide racémique.

Cette méthode est longue et délicate. Il nous a paru préférable d'en rechercher une autre plus simple et plus rigoureuse pour l'avenir.

2. — *Détermination de la nature de l'acide lactique par des préparations enzymatiques spécifiques*

La levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) cultivée en aérobiose, contient une déshydrogénase lactique qui réduit le ferricyanure, le 2-6 dichlorophénol indophénol et le cytochrome C ; elle est spécifique de l'acide L (+) lactique. Sa purification a été réalisée par BOERI (1955). Cette enzyme n'est pas décelable dans la levure cultivée en anaérobiose, (SLONIMSKI 1953).

SLONIMSKI et TYSAROWSKI (1958), ont mis en évidence dans la levure cultivée en anaérobiose une lactico-déshydrogénase qui réduit le ferricyanure et le 2-6 dichlorophénol indophénol mais pas le cytochrome C ; elle est spécifique de l'acide D (—) lactique (LABEYRIE, SLONIMSKI et NASLIN, 1959) (BOERI, CREMONA et SINGER, 1960). Cette enzyme disparaît au cours de l'adaptation respiratoire. Ces propriétés de la levure nous ont permis d'étudier la nature de l'acide lactique formé dans les cultures bactériennes.

La levure utilisée est une souche haploïde de *Saccharomyces cerevisiae* : 59 R (EPHRUSSI, HOTTINGUER et CHIMENES, 1949). Nous avons effectué les cultures anaérobies en erlenmeyer de 500 ml contenant 200 ml de milieu de culture ; après l'ensemencement, l'erlenmeyer est fermé par un bouchon de caoutchouc traversé par deux tubes de verre munis de coton stérile dont l'un plonge dans le liquide et l'autre se termine par une soupape de mercure.

On fait barboter pendant 15 mn un courant d'azote R pour chasser l'air ; les joints sont soigneusement paraffinés. Après le passage de l'azote, le tube d'entrée qui est muni d'un tuyau de caoutchouc, est fermé à son tour par une pince de Mohr.

Le milieu utilisé a la composition suivante :

Glucose	20 g
Yeast extract Difco	10 g
Ergostérol	0,05 g
— dissous dans un mélange d'éthanol (12 ml) et de Tween 80 (8 ml)	
Eau distillée	1000 ml

L'addition d'ergostérol est indispensable pour assurer la croissance de la levure en anaérobiose (ANDREASEN et STIER, 1953) (MORGAN, 1956). Les cultures aérobies ont été effectuées en erlenmeyer de 1 l contenant 100 ml du milieu de culture suivant :

Yeast extract Difco	0,5 %
Glucose	2 %

Ces cultures sont agitées (80 oscillations /minute ; amplitude 7 cm) afin que l'aération ne constitue pas un facteur limitant.

Dans les deux cas, la culture est centrifugée (5 mn à 3000 t /mn), lavée au tampon phosphate M/15 pH 7,3 et centrifugée une deuxième fois. Le dépôt obtenu est remis en suspension dans le tampon. Le broyage est effectué à l'aide d'un broyeur Virtis en présence de billes de verre Bellotini n° 18. Toutes ces opérations sont conduites à basse température ; le broyeur est arrêté après 3 mn de fonctionnement pour éviter l'échauffement. On élimine par centrifugation les cellules intactes, les débris cellulaires et les billes entraînées au lavage. La teneur du broyat en protéine est mesurée par la réaction du biuret selon STRICKLAND (1951).

On mesure les activités enzymatiques au spectrophotomètre Jobin et Yvon en suivant la réduction du ferricyanure à 420 mμ (fente 2 /100 — résistance de charge 2 — sensibilité 5).

Les conditions des tests étaient les suivantes :

Ferricyanure de potassium 10^{-2} M	0,2 ml
Lactate de sodium 10 % (D ou L)	0,2 ml
Tampon phosphate M/15 ; pH 7,3 q. s. p.	3 ml
Broyat	

On utilise un volume de broyat tel que l'on se trouve dans des conditions où la quantité de broyat soit le facteur limitant de la réaction. On mesure l'activité du broyat vis-à-vis du D lactate et du L lactate. Après s'être ainsi assuré que le broyat ne présente d'activité notable que vis-à-vis de l'un ou de l'autre des deux acides lactiques, on mesure l'activité du broyat en prenant pour substrat soit la culture bactérienne préalablement centrifugée soit le milieu de culture non ensemencé. Les conditions du test demeurent inchangées. On remplace simplement le lactate par 0,2 ml de milieu ou de culture. On détermine également l'activité endogène du broyat sur le ferricyanure de potassium (ferricyanure 0,2 ml ; broyat ; tampon phosphate q.s.p. 3 ml). Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 1 pour les cultures aérobies et le tableau 2 pour les cultures anaérobies ; les activités sont exprimées en μ molécules de lactate oxydées par minute et par mg de protéine.

TABLEAU 1

Activité des broyats des cultures anaérobies de levure

Activité endogène	Activité sur le L lactate	Activité sur le D lactate	Activité sur le milieu	Activité sur la culture bactérienne
0,015	0	0,120	0,022	0,120
0,00	0	0,120	0	0,060

Les activités sont exprimées en μ molécules de lactates oxydées par minute et par mg. de protéines.

TABLEAU 2

Activité des broyats des cultures aérobies de levure

Activité endogène	Activité sur le L lactate	Activité sur le D lactate	Activité sur le milieu	Activité sur la culture bactérienne
0	0,075	0,004	0,015	0,093
0,004	0,042	0	0,006	0,045

L'activité endogène du broyat est extraite des diverses activités. Le coefficient d'extinction moléculaire du ferricyanure est voisin de 1 000. La réaction est stœchiométrique ; la réduction de deux molécules de ferricyanure correspond à l'oxydation d'une molécule de lactate (LABEYRIE, SLONIMSKI et NASLIN, 1959).

Ces résultats montrent que la bactérie étudiée produit à la fois de l'acide D (—) lactique et de l'acide L (+) lactique. En effet, les broyats de levure anaérobies réduisent le ferricyanure au contact de la culture bactérienne aussi activement qu'au contact du D lactate ; les broyats de levure aérobie réduisent de même le ferricyanure au moins aussi rapidement au contact de la culture qu'en présence de L lactate. Dans nos conditions d'expériences l'activité endogène et l'activité sur le milieu de culture non ensemencé sont très faibles et ne peuvent gêner l'interprétation des résultats.

III. — DESCRIPTION DE LA BACTÉRIE

A. — ÉTUDE MORPHOLOGIQUE

1. — *Examen macroscopique*

— Sur milieu solide en tube incliné, on observe une croissance abondante. Les colonies sont blanches, brillantes et plates. La culture peut couvrir la totalité du tube.

— En gélose profonde, il se forme des colonies en forme de disques, blanches, opaques.

— Dans les cultures en milieu liquide, la croissance commence au fond du tube. Un trouble fin envahit progressivement le milieu mais demeure toujours plus dense au fond du tube qu'en surface. Après quelques jours, il se forme un dépôt et le liquide devient limpide. Ce dépôt est généralement assez filamenteux, particulièrement dans des vieilles cultures.

2. — *Examen microscopique*

Ce sont des bâtonnets de petite taille : 1 à 2 μ de long sur 0,5 μ de large. Ils sont groupés en général par deux dans les cultures jeunes. Il se forme des chaînes plus ou moins longues qui peuvent atteindre dans les dépôts de cultures agées, 30 à 40 μ.

La bactérie est gram +.

Elle n'est pas mobile et n'a pas de cils.

La présence de spore n'a pas été mise en évidence.

B. — CARACTÈRES PHYSIOLOGIQUES

1. — *Action de la température*

La température optimum de croissance est comprise entre 20° et 30°. Elle correspond à une croissance abondante et à la formation d'un dépôt en 4 jours.

A 35° la croissance est nettement plus lente.

La température maximum est 40°.

2. — *Action du pH*

Les pH ont été ajustés avec de la potasse ou de l'acide sulfurique.

La zone optimum de pH est comprise entre 5 et 7 ; sur milieu complet, glucosé, la croissance est pratiquement achevée après 4 ou 5 jours ; il se forme un dépôt visqueux, abondant, caractérisé par la présence de longues chaînes.

Aux pH alcalins, la croissance est plus lente. Après 15 jours de croissance aux pH 8 et 9, le dépôt est encore peu abondant et on observe simplement des diplobacilles ou de courtes chaînes ; la croissance ne semble pas terminée. Une croissance se produit encore à pH 10.

A pH 4, la croissance est également assez lente. On trouve dans une culture âgée de 15 jours des diplobacilles et des courtes chaînes ; il n'y a pas encore de dépôt.

A pH 3, la croissance est extrêmement lente mais est cependant nettement positive.

3. — *Action de l'air*

Il y a peu de différence entre une culture liquide effectuée dans les conditions normales et une culture liquide placée sous pyrogallate ; cependant, dans le premier cas, le trouble bactérien se développe surtout au fond du tube et relativement peu en surface.

Une culture abondante peut être obtenue à la surface d'un milieu gélosé au contact de l'air.

4. — *Principaux tests*

La catalase est négative.

Il n'y a pas de formation d'indol, de SH_2, de nitrite à partir des nitrates.

Il n'y a pas de dégradation de l'albumine.

Le test au rouge de méthyle est positif.

Sur lait glucosé, il n'y a ni coagulation, ni digestion.

Sur lait tournesolé on note à la fois une acidification et une réduction ; la culture devient blanche au fond du tube et rosit en surface. En fin de croissance tout le tube vire au rose.

Le test de Voges Proshauer pour la recherche de l'acétylméthylcarbinol est positif.

La culture sur pomme de terre ne donne pas de croissance visible. Cependant, un grattage permet de déceler au microscope la présence de quelques diplobacilles.

C. — Caractères biochimiques

Une étude biochimique a été effectuée pour déterminer les substances carbonées permettant un développement bactérien et pour mettre en évidence les principaux produits fournis par l'attaque de ces substances. Les cultures sont effectuées en erlenmeyer de 100 ml contenant 50 ml de milieu et bouchés au coton.

Le milieu de base utilisé a la composition suivante pour 1 000 ml d'eau distillée

Yeast extract Difco	6 g
Tween 80	0,5 ml
Fe, Mn et Mg	traces
pH = 6	

La substance carbonée à étudier est ajoutée à la dose de 20 g /litre. Le développement de la bactérie sur le milieu de base sans addition de glucide a été étudié ; les acidités totales et volatiles formées sur ce milieu ont été retranchées des résultats obtenus pour chaque substance étudiée.

I. — *Glucides*

a) *Les pentoses.*

L'arabinose est fortement attaquée ; le xylose et le rhamnose le sont plus faiblement.

Il y a formation d'acide lactique et d'acide acétique ; il n'y a pas de producton de CO_2 ni d'alcool. L'acidité volatile représente un fort pourcentage de l'acidité totale formée.

b) *Les aldohexoses.*

Glucose, mannose et galactose sont fermentés.

Cette attaque est caractérisée par une production très faible d'acides volatils. Le pourcentage de l'acidité volatile obtenue par rapport à l'acidité totale est caractéristique d'une bactérie lactique homofermentative. Il se forme de l'acide lactique et de l'acide acétique ; on n'a mis en évidence ni alcool ni gaz carbonique.

c) *Les cétohexoses.*

Le lévulose est attaqué ; le sorbose ne l'est pas.

La fermentation du lévulose donne de l'acide lactique et de l'acide acétique en faible proportion. Il ne se forme ni mannite ni alcool ni gaz carbonique.

d) *Les holosides.*

Saccharose, maltose, et lactose sont attaqués. Le Raffinose ne l'est pas. Il se forme de l'acide lactique et de l'acide acétique en faible quantité mais pas de gaz carbonique.

II. — *Alcools*

Il n'y a pas d'attaque de l'éthanol et du glycérol. Le sorbitol et le mannitol sont attaqués avec production d'acide lactique ; le développement microbien est assez faible sur ces deux substrats. Il a été mis en évidence des traces d'acide acétique mais les quantités observées sont de l'ordre de grandeur de celles trouvées sur le milieu de base.

III. — *Acides*

Les acides tartrique, citrique, malique, lactique et succinique ont été essayés comme substrat carboné. On a utilisé le même milieu de base que pour l'attaque des glucides ; le pH a été réglé à 4 par addition de potasse.

L'acide citrique et l'acide malique ont donné une faible croissance. Les autres acides ont donné une croissance inférieure à celle obtenue sur le milieu de base sans addition de substrat carboné.

L'utilisation de l'acide malique et de l'acide citrique a été étudiée sur jus de tomate filtré ; la croissance de la bactérie est lente mais elle devient très rapide si on élève légèrement le pH par addition de potasse (pH 5).

L'acide malique disparaît rapidement dans ces conditions mais on retrouve après un mois des quantités d'acide citrique voisines des doses initiales. Il ne semble pas que l'acide citrique soit détruit par cette bactérie.

TABLEAU 3

Attaque des glucides et des alcools

	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Glucose	Mannose	Galactose	Levulose	Sorbose	Saccharose	Maltose	Lactose	Raffinose	Sorbitol	Mannitol	Glycérol	Éthanol
Intensité du trouble bactérien.....	++	+	+	++	++	++	++	—	++	++	++	—	+	+	—	—
pH final	3,3	4,6	4,2	3,2	3,2	3,5	3,2	5	3,2	3,2	3,7	5,4	3,8	3,8	4,9	
Acidité totale	94	8	12	60	75	40	80	3	78	70	28	0	26	20	3	0
Acidité volatile	24	3	3	2,2	0,8	2,4	2	0	1,6	1,2	4	0	0	0	0	0
Pourcentage d'acidité volatile	25	37	25	3,7	1	8	2,5	0	2	1,7	14	0	0	0	0	0

Les acidités sont données en méq/l.
Les titrations ont été faites à la phénol-phtaléine.
Le nombre de croix est en relation avec l'évolution du trouble bactérien par Néphélométrie.

IV. — DISCUSSION ET CONCLUSION

La bactérie que nous venons de décrire présente les caractéristiques d'un lactobacille homofermentatif. Sa température optimum de croissance est faible et permet de la classer dans le groupe qui comprend : *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus leichmanii* et *Lactobacillus plantarum*. Enfin, elle produit de l'acide lactique racémique comme le *Lactobacillus plantarum* (Breed Murray et Smith, 1957).

La comparaison des différents caractères de cette bactérie et des trois espèces citées met en évidence une affinité particulièrement nette avec *L. plantarum*. La bactérie que nous venons de décrire diffère de *L. casei* par la fermentation du saccharose ; elle diffère également de *L. leichmanii* par la fermentation du lactose et de l'arabinose. Nous pouvons donc la rattacher à *L. plantarum*.

Fred, Peterson et Anderson (1921) ont déjà décrit sous le nom de *Lactobacillus arabinosus* une souche de *L. plantarum* capable de décarboxyler l'acide malique. Lambion et Meskhi (1957) ont également isolé des lactobacilles homofermentatifs à partir de vins de fruits présentant une fermentation malolactique. La possibilité de dégrader l'acide malique en acide lactique est donc une propriété répandue chez de nombreuses souches de *Lactobacillus plantarum*.

Il semble que les bactéries appartenant à cette espèce jouent un rôle important dans de nombreux celliers du vignoble des sables.

Les caractéristiques de la souche que nous venons de décrire, rendent souhaitable son expérimentation dans les caves où l'on désire provoquer la fermentation malolactique.

Reçu pour publication en février 1962.

SUMMARY

STUDY OF A HOMOFERMENTATIVE LACTOBACILLUS ISOLATED FROM WINE

A strain of *Lactobacillus plantarum* capable of producing malolactic fermentation has been isolated from a grape wine.

A simple method is described for determining whether the lactic acid produced by a bacterium is L (+) lactic acid, D (—) lactic acid or racemic lactic acid. This method is based upon the utilisation of the lactic-dehydrogenase properties of yeast. Yeast cultivated under aerobic conditions possesses a L (+) lactic-dehydrogenase which reduces ferricyanide ; on the other hand, yeast cultivated under anaerobic conditions a D (—) lactic-dehydrogenase which will also reduce ferricyanide. Hence the nature of the lactic acid formed in a bacterial culture may be determined by the use of ground yeasts cultivated either under aerobic or trictly anaerobic conditions.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Andreasen A. A., Stier T. J. B., 1953. Anaerobic nutrition of Saccharomyces cerevisiae. I Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **41**, 23-36.

Barre P., Galzy P., 1960. Étude d'une nouvelle bactérie malolactique. *Ann. Technol. agric.*, **4**, 331-343.

Boeri E., Cutolo E., Luzzati M., Tosi L., 1955. Preparation and properties of cytochrome b_2 from yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, **56**, 487-499.

BOERI E., CREMONA T., SINGER T. P., 1960. The D-α-hydroxyacid deshydrogenase of yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2**, 298-302.

BREEDS R. S., MURRAY E. G. D., SMITH N. R., 1957. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 7e Edi. The Williams and Wilkins Co.

CHEFTEL R. T., MUNIER R., MACHEBŒUF M., 1951. Micro-chromatographie de partage sur papier des acides aliphatiques, hydrosolubles et non volatils. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **33**, 7, 840-845.

CORDONNIER R., BIZEAU C., 1960. Séparation par chromatographie d'échange d'ions et dosage des acides lactique, succinique et malique du vin. *Ann. Technol. agric.*, **4**, 349-362.

EPHRUSSI B., HOTTINGUER H., CHIMENES A. M., 1949. Action de l'acriflavine sur les levures. La mutation « petite colonie ». *Ann. Inst. Pasteur.*, **76**, 351.

FLANZY M., BOUZIGUES Mme L., BOUZIGUES H., 1955. La détermination chimique du degré alcoolique du vin par le mélange sulfo-chromique. *Ann. Technol. agric.*, **4**, 397-415.

FRED, PETERSON, ANDERSON, 1921. *J. Biol. Chem.*, **48**, 410 (cité in Bergey's manual of determinative bacteriology).

GAYON U., DUBOURG E.,1901. Nouvelles recherches sur le ferment mannitique. *Ann. Inst. Pasteur*, 15, 527-569.

JOLIVET R., 1957. Comtribution à l'étude des fermentations. Analyse chromatographique des acides gras volatils. *Ann. Inst. Agric. Algérie*, **10**, nº 6.

LABEYRIE F., SLONIMSKI P. P., NASLIN L., 1959. Sur la différence de stéréospécificité entre la déshydrogénase lactique extraite de la levure anaréobie et celle extraite de la levure aérobie. *Biochem. Biophys. Acta*, **34**, 262-265.

LAMBION R., MESKHI A., 1957. Les bactéries de la fermentation malolactique. *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, 12, 131-144.

LANGERON M., GUERRA M., 1938. Nouvelles recherches de Zymologie médicale. *Ann. Parasitol.*, **16**, 36.

MORGAN H., 1956. Occurence of respiration deficient mutants in backer's yeast cultivated anaerobically. *J. Cell. comp. Physiol.*, **48**, 95-112.

SLONIMSKI P. P., 1953. Formation des enzymes respiratoires chez la levure. Masson et Cie, Paris.

SLONIMSKI P. P., TYSAROWSKI W., 1958. Sur l'existence de deux déshydrogénases lactiques chez la levure et sur la conversion au sein de la cellule de l'une en l'autre. *C. R. Acad. Sci.*, **246**, 1111-1114.

SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS, 1957. Manual of microbiological methods, routine tests for identification of Bacteria, Mc Graw Hill Book Company.

STRICKLAND L. H., 1951. The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 698-703.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (2), 131-144.

RECHERCHES SUR L'EXTRACTION ET LE DOSAGE DE L'ACIDE SORBIQUE DANS LES VINS

H. BIOL et Ch. FOULONNEAU

Station œnologique, Centre de Recherches agronomiques du Centre-Est, Beaune (Côte-d'Or).

SOMMAIRE

Les Auteurs ont voulu utiliser la méthode chromatographique préconisée par SUDARIO pour la recherche de l'acide sorbique. Ils ont voulu la rendre quantitative.

Ils ont examiné les conditions préliminaires opératoires d'autres méthodes, à savoir le procédé employé pour extraire l'acide par entraînement à la vapeur d'eau.

Enfin, ils décrivent une méthode d'extraction directe de l'A. S. contenu dans le vin par chromatographie unidimensionnelle ascendante, et révélation par lumière ultra violette de $\lambda = 2\,537$ Å, et un dosage semi-quantitatif par comparaison de la tache obtenue avec une gamme de taches étalonnées. Les résultats sont satisfaisants, et le procédé est rapide et pratique.

I. — INTRODUCTION

Une circulaire ministérielle, en date du 15 octobre 1959, autorise, à titre d'essai, l'emploi de l'A. S.

La dose limite autorisée est de 200 mg/litre, sous réserve que la dose d'anhydride sulfureux ne dépasse pas 250 mg/litre. De plus, il devra être fait mention (sauf pour les ventes au détail ou directes à la consommation) sur les récipients et les factures, de la dose d'acide utilisée.

Le but recherché est de pouvoir conserver des vins plus ou moins liquoreux, en limitant, dans des proportions appréciables, la dose d'anhydride sulfureux nécessaire à leur stabilisation.

Les travaux de divers auteurs ont précisé le rôle, le mode d'action et les doses d'emploi de l'A. S. (L. BAILLOT-d'ESTIVAUX, 1959 ; D. FLORENTIN, 1959 ; A. BARRET, P. BIDAN, 1960 ; E. PEYNAUD, 1960 ; A. PUISSANT, 1960 ; P. F. CHENARD, 1960 ; Station de Recherches viticoles d'Angers, 1960).

L'usage de l'A. S. risquant de s'étendre et ses conditions d'emploi étant réglementées, il convenait de l'isoler et de le doser.

De nombreux auteurs ont étudié ce dosage qui a recours à des méthodes physiques ou chimiques.

Les auteurs du présent travail se sont orientés vers la méthode chromatographique préconisée par SUDARIO, qui s'est lui-même inspiré de la méthode d'ECKAUT.

Ce dosage est purement qualitatif.

Il fallait préciser au moins l'ordre de grandeur des quantités d'A. S. contenues dans la prise d'essai.

En premier lieu, il importait donc d'être certain que tout l'acide était extrait par la méthode préconisée par SUDARIO.

C'est ainsi qu'il a été constaté que, pour obtenir la totalité de l'A. S., le distillat devait être considérablement augmenté en volume, ce qui avait pour conséquence de diluer l'acide y contenu, et obligeait également à faire des lavages importants avec l'éther, d'où les risques de pertes. Aussi a-t-il fallu s'orienter vers une révélation plus subtile.

Certains auteurs utilisent l'absorption des rayons U V en spectrophotométrie. A cet effet, il a semblé logique que les taches chromatographiques d'A. S. devaient absorber les rayons U V de même longueur d'onde, et les rendre visibles, ce qui a été vérifié.

Cette révélation étant de grande sensibilité, il a, dès lors, été possible de chromatographier directement les distillats, en ne réservant les lavages à l'éther que dans les cas d'extrêmes dilutions.

Ces premières constatations ont orienté les travaux dans deux directions :

1° L'étude des conditions d'extraction de l'A. S. par entraînement à la vapeur d'eau.

2° La mise au point d'une technique chromatographique applicable directement au distillat, ou mieux encore, directement au vin.

II. — MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

a) Conditions générales de travail

L'étude des extractions par la vapeur d'eau a porté sur des solutions d'A. S. introduit dans les prises d'essai sous forme de sorbate de potassium. Les distillats ont été chromatographiés directement sans concentration par lavage à l'éther, sauf cas exceptionnel qui sera signalé.

Les taches chromatographiques comparées à des taches de titre connu permettent d'apprécier le nombre de γ extraits dans chaque distillat, et d'établir ainsi le taux d'extraction, et éventuellement de construire des courbes.

Le papier Schleicher et Schüll 2043 *b* a donné des taches bien délimitées.

Le solvant utilisé est le suivant :

n-butanol	35 volumes
Ammoniaque 22° Bé au 1/10	65 volumes

Il a été signalé, dans une précédente communication (BIOL et FOULONNEAU, 1961), que ce solvant n'est pas affecté par la présence des sucres.

Un développement de quelques heures, à une température de 20° C est suffisant.

b) Conditions de concentration de l'A. S. par l'éther

SUDARIO lave les 100 ml acidifiés du distillat par trois fractions de 30 ml d'éther.

JAULMES préconise deux lavages, employant pour chacun un volume égal à celui du distillat.

Quant à JACQUIN, il dit que l'extraction éthérée ne lui permet d'obtenir que 70 à 80 p. 100 de l'A. S. mis en œuvre.

Dans les présents essais, l'extraction éthérée n'est utilisée comme procédé de concentration que dans un cas.

Cette technique s'étant révélée sans intérêt n'a pas été étudiée plus avant.

c) Conditions de révélation

Le pourpre de Bromocrésol étant d'une sensibilité assez faible, c'est l'examen direct du chromatogramme sous la lampe à UV de $\lambda = 2\,537$ Å qui est utilisé.

A l'origine, les taches de dépôt sur le papier mesurent 2 cm de longueur, chaque tache étant séparée de la suivante par un espace équivalent.

Le développement du solvant n'étale presque pas la tache qui reste bien compacte. L'étalement, assez faible, a lieu surtout dans le sens du développement. Cette compacité de la tache devient gênante pour l'appréciation quantitative, l'étalement des taches n'ayant aucun rapport avec les concentrations.

Enfin, l'intensité de l'absorption est telle qu'à partir de 1,5 γ d'A. S., il n'est plus possible d'apprécier les variations de concentration, la coloration bleu-noir devenant trop opaque.

C'est donc vers les faibles concentrations qu'il faut orienter l'appréciation quantitative.

Les essais d'appréciation visuelle ont permis de constater que la limite inférieure de sensibilité est de 0,10 γ d'acide sorbique dans la tache. Il est donc possible d'examiner directement les distillats sans qu'il soit nécessaire d'effectuer des concentrations éthérées.

d) Matériel d'extraction de l'acide sorbique

Les résultats des essais préliminaires effectués avec l'appareil d'ARCHINARD n'étant pas supérieurs à ceux obtenus avec l'appareil JAULMES, seul ce dernier a été utilisé.

Les conditions de fonctionnement du réchauffeur de 350 watts-24 volts ont été étudiées, de façon à obtenir l'incidence de la variation du volume résiduaire de la prise d'essai, sur l'extraction de l'A. S.

En fonctionnement normal, le résidu est de 18-20 ml pour une prise d'essai de 20 ml, et un volume de distillat de 200 ml.

En non-fonctionnement, il est de 55 ml.

En fonctionnement exagéré, il peut descendre à 7-8 ml. Dans chaque cas, une première fraction de 300 ml du distillat a été éliminée et la suivante, de 100 ml, chromatographiée ; les résultats sont les suivants :

Fonctionnement nul	il reste 6 % d'A. S.
Fonctionnement normal	il reste 2 % d'A. S.
Fonctionnement exagéré	Absence de tache

Le taux d'extraction est donc nettement sous la dépendance du fonctionnement du réchauffeur.

Les essais seront conduits avec un appareil en fonctionnement normal.

Seul l'acide à l'état libre est entraîné par la vapeur. Il convient donc, en solution pure de sorbate de potassium, de déplacer le cation par un acide fixe. La nature de celui-ci : phosphorique, tartrique ou citrique, est sans influence.

En conséquence, il est ajouté, à la prise d'essai, 1 ml d'acide phosphorique sirupeux, quel que soit le cas étudié : solution pure ou prise de vin.

III. — RÉSULTATS

A. — EXTRACTION DE L'A. S. PAR ENTRAINEMENT A LA VAPEUR D'EAU

a) Extraction en 6 fractions de 100 ml de distillat

Cette extraction fractionnée a pour but de vérifier jusqu'à quel volume de distillat on doit parvenir pour obtenir une extraction totale.

La prise d'essai de 20 ml de solution pure de sorbate de potassium contenant

4 000 γ exprimés en acide sorbique, est introduite dans l'appareil avec 1 ml d'acide phosphorique. On recueille 6 fractions de 100 ml. de distillat, numérotées de 1 à 6.

Une fraction des distillats est déposée sur une feuille de papier à chromatographie. Les dépôts sont de 200 µl. On constate des taches visibles jusqu'à la 4e fraction incluse. Par comparaison avec les solutions témoins, on peut établir la quantité d'A. S. extrait dans chaque fraction.

Quant aux 5e et 6e fractions très diluées, il est nécessaire d'en concentrer une partie par extraction à l'éther.

A cet effet, 10 ml de distillat sont lavés avec deux fractions de 10 ml d'éther. On évapore. Le résidu est ramené à 1 ml avec de l'eau ammoniacale, puis chromatographié et évalué comme précédemment.

La totalisation du nombre de γ extraits dans les 6 fractions n'atteint pas les 4 000 γ mis en œuvre. Elle n'en représente, dans les meilleures conditions, que 95 p. 100. On pourrait penser, soit à des pertes, soit à une sous-évaluation des fractions extraites. Pour essayer de résoudre cette question, le résidu d'extraction a été récupéré en fin de distillation, lavé à l'éther et l'éther évaporé. Quelques gouttes d'eau ammoniacale ont été introduites au fond du tube renfermant le résidu d'évaporation de l'éther. La chromatographie n'a alors révélé aucune tache d'A. S.

On peut donc en déduire que c'est l'appréciation visuelle qui est en défaut.

— On notera qu'un essai a été réalisé dans le but de savoir si le séchage du chromatogramme par l'air chaud et sous lumière artificielle pouvait détruire partiellement l'A. S.

Aucune influence n'a été constatée pour des temps normaux de séchage. Si cette influence existe, elle doit être assez limitée.

Les résultats obtenus permettent de construire une courbe d'extraction. Celle-ci représente le taux d'extraction contenu dans chaque fraction relativement à la quantité totalisée dans les 6 fractions.

Si $a, b, c, ..f$ représentent le nombre de γ extraits dans les fractions 1, 2, 3, ..6 le taux de la fraction 1 sera :

$$\frac{a \times 100}{a + b + c \cdots + f}.$$

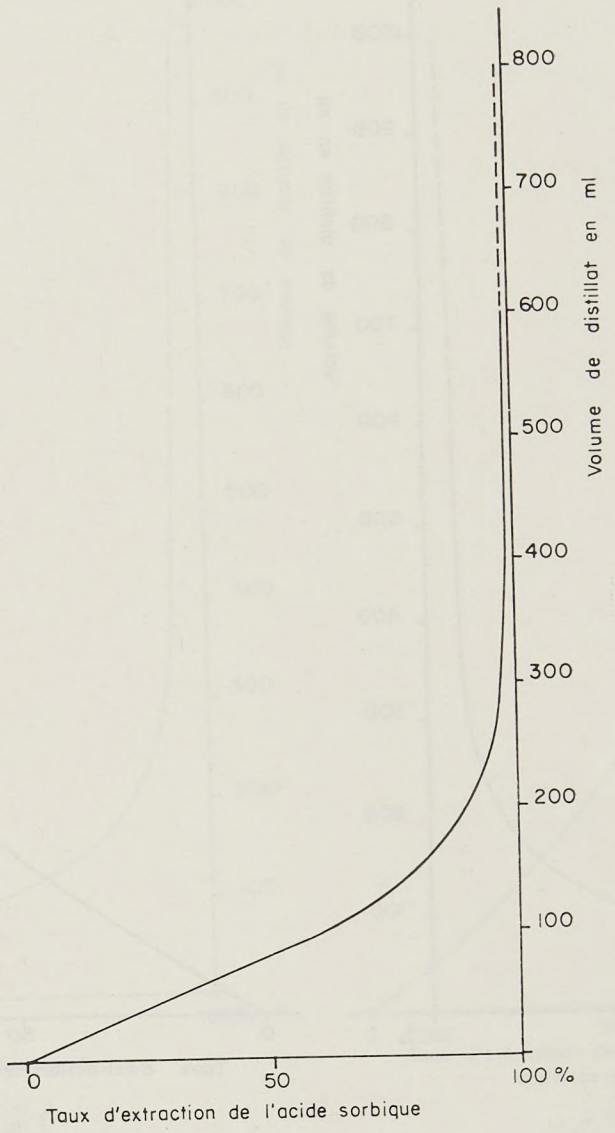
Les taux sont cumulés de fraction à fraction ; la forme de la courbe reste valable même avec la sous-évaluation visuelle. Ce qui reste en valeur absolue, c'est la présence nette d'A. S. dans les fractions 4 et 5 et tendant vers zéro pour la fraction 6 (voir courbe 1).

Il résulte de l'examen de cette courbe que l'extraction devient pratiquement totale lorsqu'un volume de 500 ml est extrait. L'appareil a fonctionné de telle sorte que le volume de résidu d'extraction était de 20 ml après extraction de 200 ml de distillat, et de 14-15 ml en moyenne en fin de distillation des 6 fractions (600 ml).

b) *Influence simultanée des concentrations et des volumes des prises d'essai*

1° *Doses constantes d'A. S. dans des volumes variables de prises d'essai* :

4 000 γ dans 20 ml.
4 000 γ dans 100 ml.

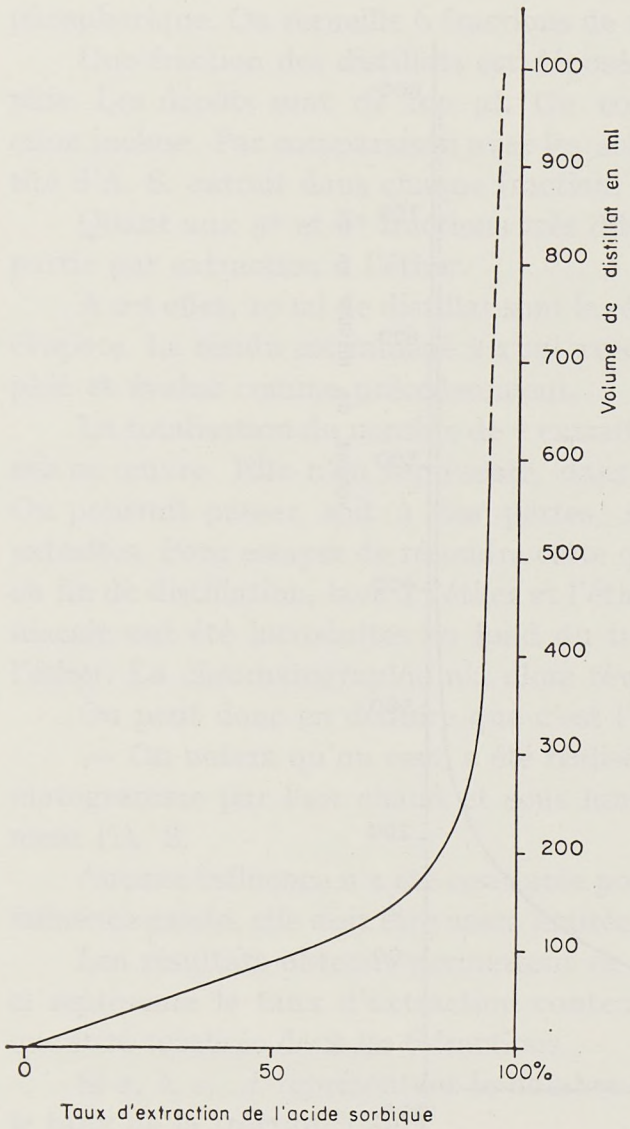


Courbe 1

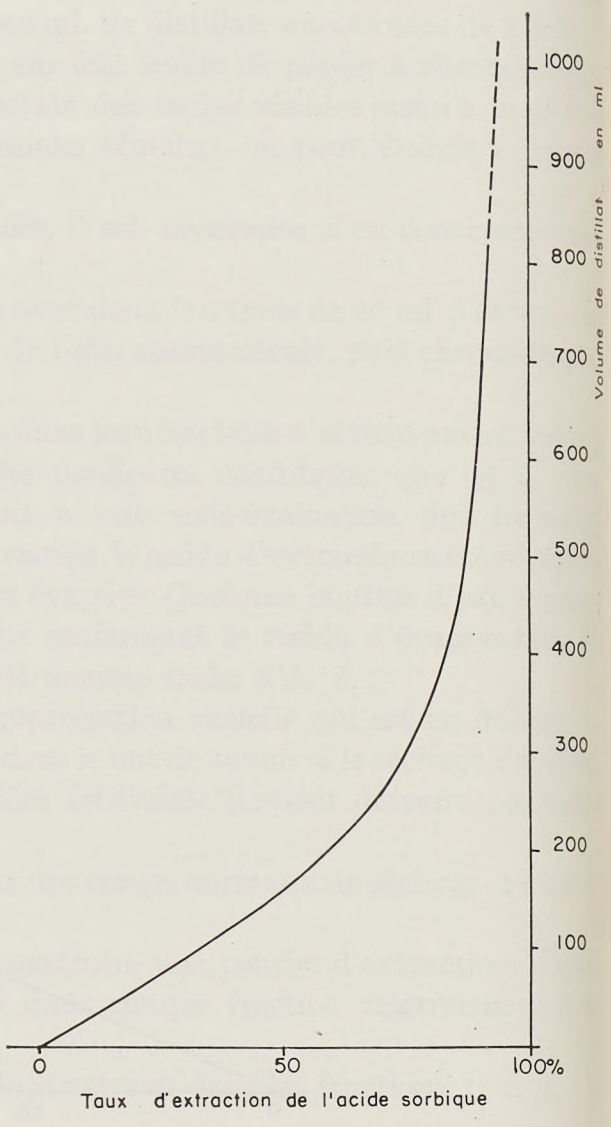
Les distillats sont récupérés par fraction de 100 ml. On chromatographie, et évalue le taux extrait dans chaque fraction :

	20 ml %	100 ml %
1e fraction	57,5	32,5
après la 2e fraction	85,5	59
après la 3e fraction	91,1	76
après la 4e fraction	92,8	82,3
après la 5e fraction	93,6	86,7
après la 6e fraction	93,8	89
après la 7e fraction		91
après la 8e fraction		92

Les courbes 2 et 3 représentent ces extractions. La comparaison des courbes montre que l'extraction est retardée quand le volume de la prise d'essai augmente.



Courbe 2
4000 γ dans 20 ml



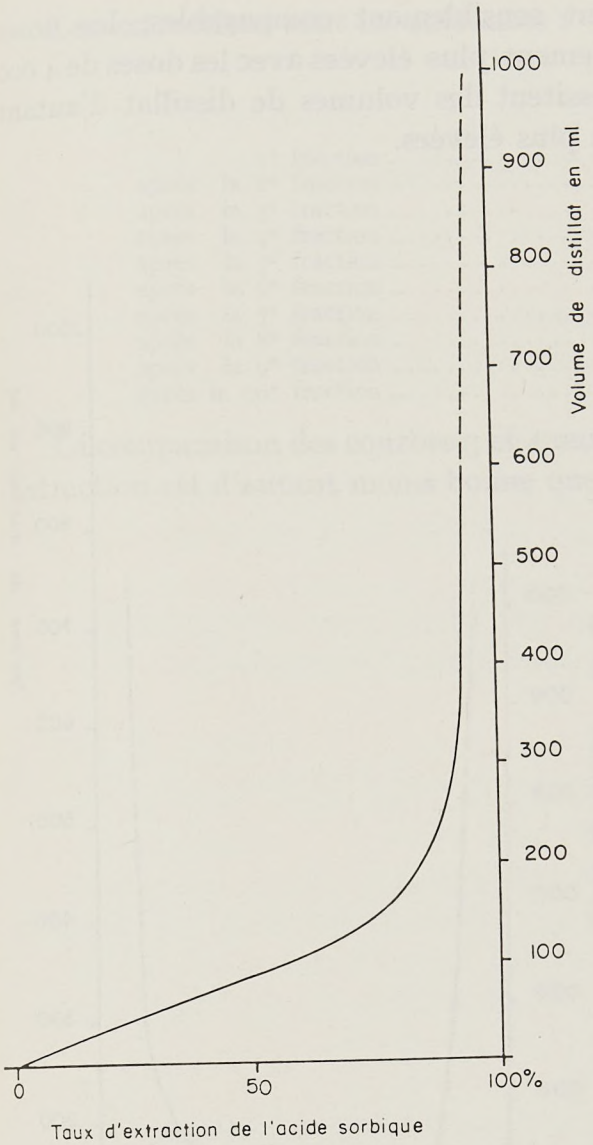
Courbe 3
4000 γ dans 100 ml

2° *Concentration constante d'A. S. dans des volumes variables de prise d'essai :*

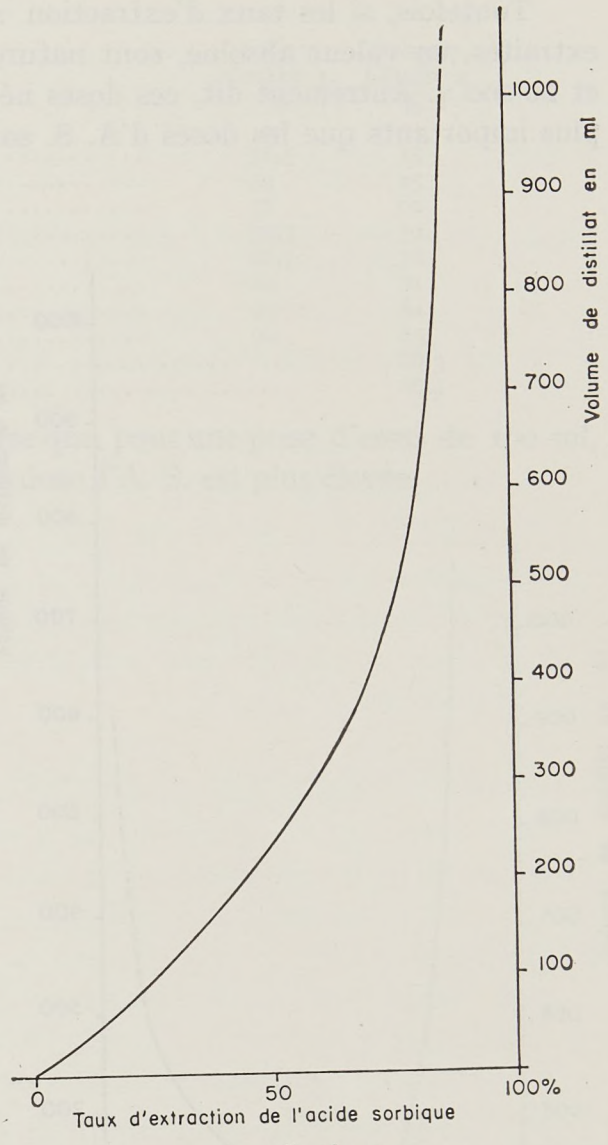
4 000 γ dans 20 ml.
20 000 γ dans 100 ml.

	20 ml %	100 ml %
1e fraction	57,5	25
après la 2e fraction	85,5	45
après la 3e fraction	91,1	60
après le 4e fraction	92,8	70
après la 5e fraction	93,6	76
après la 6e fraction	93,8	81
après la 7e fraction		84
après la 8e fraction		85
après la 9e fraction		86,3
après la 10e fraction		86,9

Les courbes 2 et 4 représentent ces extractions. La comparaison des courbes montre que l'extraction est retardée quand le volume de la prise d'essai augmente.



Courbe 2
4000 γ dans 20 ml



Courbe 4
20 000 γ dans 100 ml

3° *Doses variables d'A. S. dans des volumes constants.*

α) Prise d'essai de 20 ml.

Doses examinées :

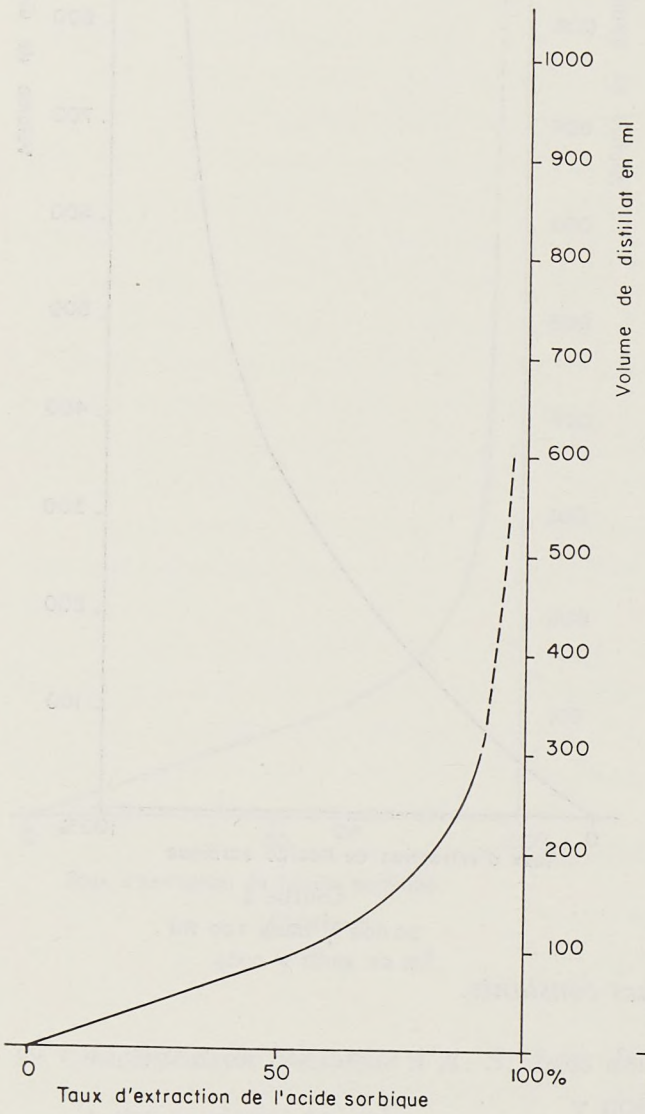
800 γ
4 000 γ
20 000 γ

Les extractions sont les suivantes :

	800 γ Courbe 5 %	4 000 γ Courbe 2 %	20 000 γ Courbe 6 %
1e fraction	56,5	57,5	60
après la 2e fraction	81,5	85,5	85
après la 3e fraction	91	91,1	90
après la 4e fraction		92,8	91
après la 5e fraction		93,6	91,25
après la 6e fraction		93,8	...

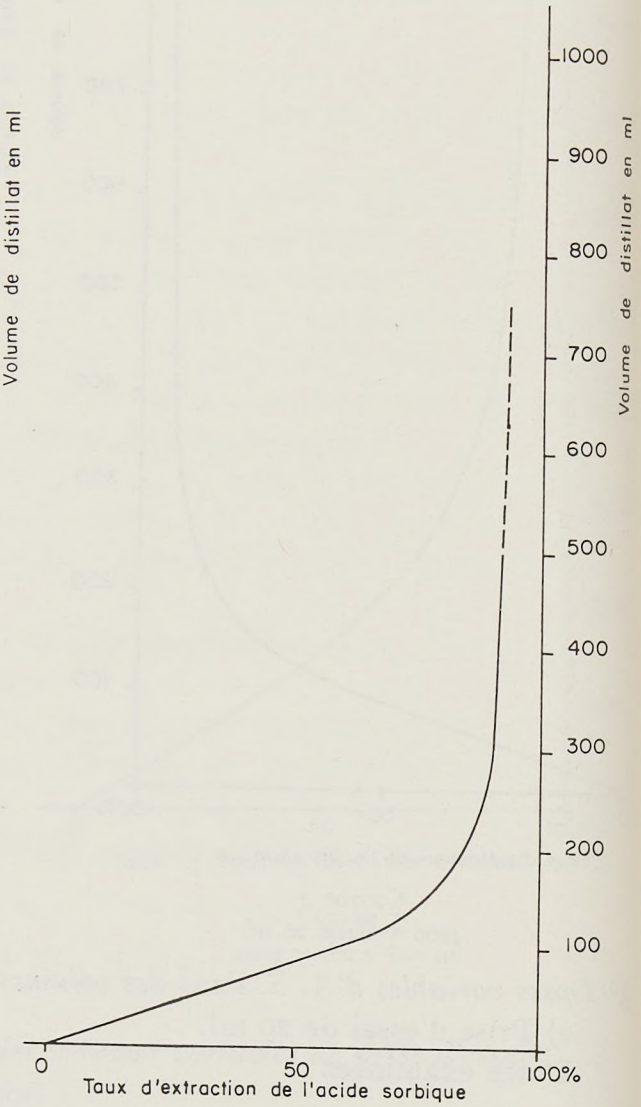
Les courbes sont pratiquement les mêmes, compte tenu du degré de précision visuelle, et dans les limites des essais.

Toutefois, si les taux d'extraction sont sensiblement comparables, les doses extraites, en valeur absolue, sont naturellement plus élevées avec les doses de 4 000 et 20 000 γ. Autrement dit, ces doses nécessitent des volumes de distillat d'autant plus importants que les doses d'A. S. sont plus élevées.



Courbe 5

800 γ dans 20 ml



Courbe 6

20000 γ dans 20 ml

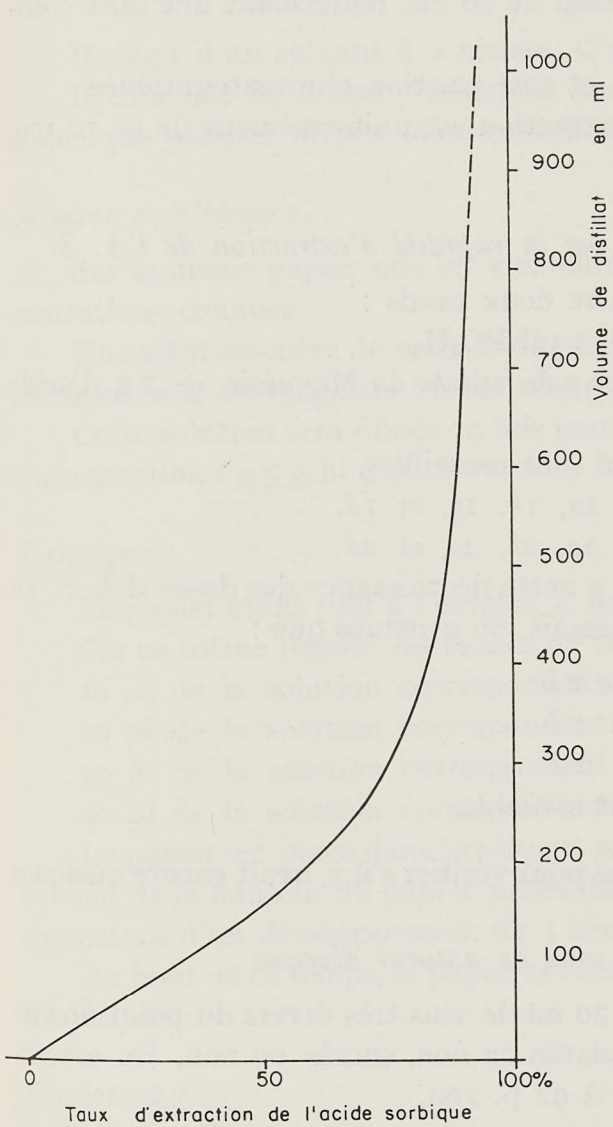
Les 800 γ d'A. S. dans 20 ml représentent 4 g/hl.
Les 4 000 γ d'A. S. dans 20 ml représentent 20 g/hl.
Les 20 000 γ d'A. S. dans 20 ml représentent 100 g/hl.

β) Prise d'essai de 100 ml.
Doses d'acide expérimentées : 4 000 γ.
20 000 γ

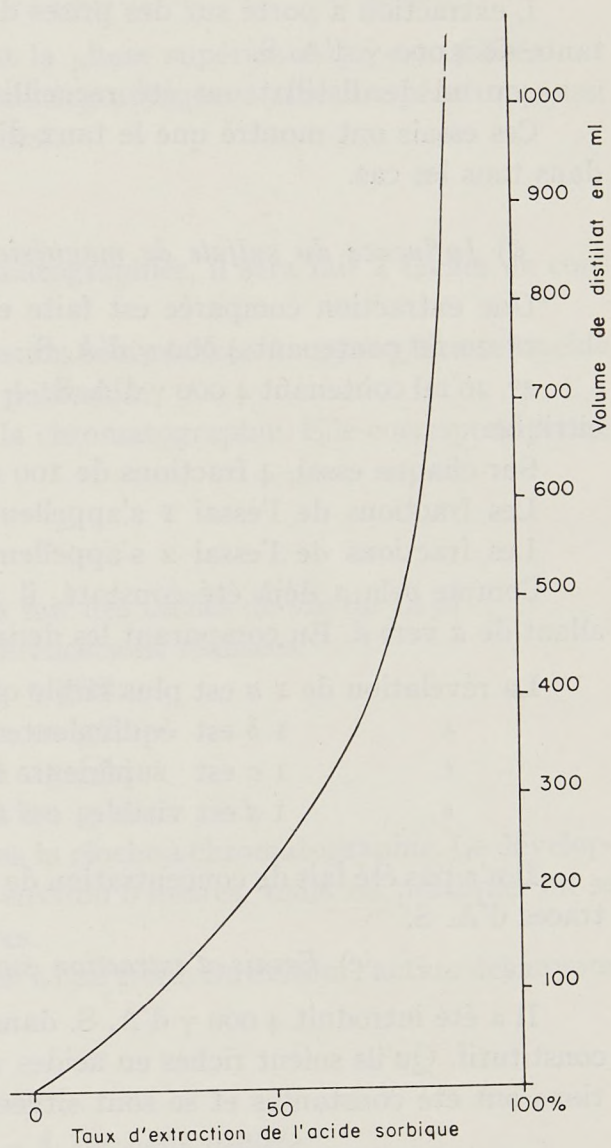
Les extractions sont les suivantes :

	4 000 γ Courbe 3 %	20 000 γ Courbe 4 %
1e fraction	32,5	25
après la 2e fraction	59	45
après la 3e fraction	76	60
après la 4e fraction	82,3	70
après la 5e fraction	86,7	76
après la 6e fraction	89	81
après la 7e fraction	91	84
après la 8e fraction	92	85
après la 9e fraction		86,3
après la 10e fraction		86,9

La comparaison des courbes 3 et 4 montre que, pour une prise d'essai de 100 ml, l'extraction est d'autant moins bonne que la dose d'A. S. est plus élevée.



Courbe 3
4000 γ dans 100 ml



Courbe 4
20000 γ dans 100 ml

A signaler que le volume de distillat récupéré lors des prises d'essai de 20 ml se limite à 600 ml car, au delà, on observe une concentration sensible de la prise d'essai.

Si l'on compare les résultats de ces trois séries d'essais, on en déduit que le volume de la prise d'essai devrait se limiter à 20 ml, et que le volume de distillat ne devrait pas être inférieur à 500 ml.

c) *Influence de la nature des solutés sur le taux d'extraction*

Les mélanges suivants ont été examinés :

a) 15 p. 100 d'alcool, sans sucre.

b) 15 p. 100 d'alcool + 50 g/litre de glucose.

c) Mélange volatil comprenant : acides acétique et formique ;
alcool
sans sucre.

d) Même mélange volatil + 50 g litre de glucose.

L'extraction a porté sur des prises d'essai de 20 ml, renfermant une dose constante de 4 000 γ d'A. S.

400 ml de distillat ont été recueillis, et une fraction chromatographiée.

Ces essais ont montré que le taux d'extraction est uniformément de 92 p. 100, dans tous les cas.

d) *Influence du sulfate de magnésie sur la rapidité d'extraction de l'A. S*

Une extraction comparée est faite entre deux essais :

1° 20 ml contenant 4 000 γ d'A. S. + 1 ml PO_4H_3

2° 20 ml contenant 4 000 γ d'A. S. + 20 g de sulfate de Magnésie + 1 g d'acide citrique.

Sur chaque essai, 4 fractions de 100 ml sont recueillies.

Les fractions de l'essai 1 s'appellent 1*a*, 1*b*, 1*c*, et 1*d*.

Les fractions de l'essai 2 s'appellent 2*a*, 2*b*, 2*c*, et 2*d*.

Comme cela a déjà été constaté, il y a nette décroissance des doses d'A. S. en allant de *a* vers *d*. En comparant les deux essais, on constate que :

La révélation de 1 *a* est plus faible que 2 *a*
« 1 *b* est équivalente à 2 *b*
« 1 *c* est supérieure à 2 *c*
« 1 *d* est visible ; 2 *d* est invisible.

Il n'a pas été fait de concentration de 2*d* pour vérifier s'il y avait encore quelques traces d'A. S.

e) *Essais d'extraction sur vins de natures diverses*

Il a été introduit 4 000 γ d'A. S. dans 20 ml de vins très divers du point de vue constitutif. Qu'ils soient riches en acides volatils ou non, sucrés ou non, les extractions ont été constantes et se sont situées à 92 p. 100.

B. — Chromatographie unidimensionnelle ascendante directe de l'A. S. sur vin, et révélation par rayons UV

Les principes du dosage sont indiqués dans une note précédente (H. Biol et Ch. Foulonneau, 1961),

Mode opératoire.

Papier : On utilisera, soit Arches 302, soit Schleicher et Schüll 2043 *b*.

Ce papier est découpé en bandes de 20 cm de hauteur.

A 2 cm de la base, une ligne est tracée, et sur celle-ci des points sont faits tous les 2 cm.

La tache aura une largeur de 2 cm et sera séparée de la suivante par un espace de 2 cm.

La chromatographie se fait en technique ascendante.

Le papier sera donc roulé en cylindre ; la jointure des bords se fera avec du papier collant.

Solvant : (SUDARIO, E., 1959 ; GUIMBERTEAU G., PORTAL E., 1961).

n-butanol.....	35 volumes
Ammoniaque 22° Bé au 1/10.....	65 volumes

Il s'agit d'un solvant à 2 phases. C'est la phase supérieure qui est utilisée.

Il convient de laisser l'ensemble chromatographique à une température aussi stable que possible (éviter soleil et radiateurs).

Solution de référence.

Sur le même papier que les vins chromatographiés, il sera fait 4 taches de concentrations connues.

Une solution-mère de sorbate de potassium sera réalisée à 0,500 g/litre en acide sorbique, soit 0,675 g/litre en sorbate de potassium.

Cette solution sera diluée 10 fois pour la chromatographie. Elle correspond à une concentration de 5 g/hl d'A. S.

Technique :

Le papier étant prêt à l'emploi, il sera fait des taches de vin de 10 µl.

Sur ce même papier, les taches de référence sont réalisées.

10 µl de la solution correspondent à 5 g/hl.

20 µl de la solution correspondent à 10 g/hl.

30 µl de la solution correspondent à 15 g/hl.

40 µl de la solution correspondent à 20 g/hl.

Le papier est placé dans le solvant sous la cloche à chromatographie. Le développement de la hauteur du papier nécessite environ 8 heures, mais en pratique, on se contentera d'un développement de 3 heures.

Au bout de ce temps, le papier est séché à l'air froid. On évitera l'action des rayons solaires.

Révélation :

La lampe de longueur d'onde de 2 537 Å est seule utilisée.

L'A. S. donne une tache bleu-noir.

Par comparaison avec les taches témoins, on en déduit l'ordre de grandeur de la concentration.

L'acide benzoïque ne donne ni absorption, ni fluorescence.

L'acide salicylique donne une fluorescence intense bleu pâle.

Enfin, JAULMES et ses collaborateurs ont signalé que l'anhydride sulfureux absorbait les rayons UV et perturbait le dosage spectrophotométrique.

La chromatographie évite ce risque d'erreur.

Du sulfite de soude a été déposé sur le papier chromatographique, d'une part à froid, d'autre part, sous courant d'air chaud.

Le développement a été fait avec le butanol ammoniacal.

La révélation sous lumière UVmontre une tache de sulfite correspondant au dépôt réalisé à froid, et une absence de révélation pour le dépôt réalisé à chaud.

Dans le vin, les sulfites sont décomposés en libérant l'anhydride sulfureux qui est éliminé lors du séchage à chaud du chromatogramme. Ils ne peuvent donc créer de confusion.

On peut considérer que la chromatographie est très spécifique et que la révélation ultraviolette de très grande sensibilité permet d'obtenir des résultats très convenables.

Sans doute, la chromatographie de volumes importants de liquide permettrait de recueillir, par élution, des doses suffisantes d'A. S. pour envisager leur dosage selon d'autres méthodes.

IV. — DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Il résulte que, dans les conditions du présent travail, l'extraction de l'A. S. par entraînement à la vapeur d'eau exige, pour être pratiquement totale, des volumes de distillat très supérieurs à ceux habituellement utilisés.

Le taux d'extraction ne semble pas affecté par la composition des solutés ou des vins mis en œuvre.

Par contre, l'action activante du sulfate de magnésie sur l'entraînement de l'A. S. par la vapeur, est très nette.

Les auteurs suivants préconisent :

Noms des auteurs	V Volume du distillat	v Volume de la prise d'essai	V/v
PEYNAUD (FLORENTIN D. 1959)	400 ml	10 ml	40
P. F. CHENARD, 1960	500 ml	50 ml	10
E. SUDARIO, 1959	100 ml	100 ml	1
P. SPANYAR et A. SANDOR, 1959	200 ml	20 ml (av. sulf. Mg)	10
H. J. HARDON et D. VISSER, 1959	200 ml	50 ml (av. sulf. Mg)	4
MELNICK et LUCKMANN / DIEMAIR et FRANZEN (JACQUIN P. 1960)	?	50 ml (av. sulf. Mg)	?
P. JACQUIN, 1960	200 ml	50 ml	4
BOESEKEN et GELBER (JACQUIN P. 1960)	200 ml	50 à 100 ml (av. sulf. Mg)	2 à 4
JAULMES, 1961	200 à 300 ml	20 ml	10 à 15

Si l'on appelle V le volume du distillat

v le volume de la prise d'essai

c la concentration en A. S.

La formule générale de l'extraction est :

$V = f(c, v)$ avec $V/v \geqslant 25$,

et $c \leqslant 4\,000\ \gamma$ dans 20 ml.

Seul PEYNAUD recueille un volume de distillat suffisant, alors que tous les autres auteurs — même lorsque le sulfate de magnésie est utilisé — recueillent un volume nettement insuffisant.

Il ne sera pas discuté des causes d'erreur des différentes méthodes proposées. JACQUIN, dans un travail très documenté, a nettement laissé percevoir les failles de certaines d'entre elles.

On peut compléter la critique de JACQUIN en disant que les dosages, qu'ils soient physiques ou chimiques, ne portent pas sur la totalité de l'A. S.

Les résultats devraient donc être inférieurs à la quantité de l'acide mis en jeu, sinon, on doit admettre que d'autres produits sont dosés, voire même que certaines méthodes ne sont pas adaptées au dosage.

A cet égard, DIEMAIR et FRANZEN, ainsi que JACQUIN, sembleraient confirmer ces dires ; de même JAULMES et ses collaborateurs qui ont constaté que l'anhydride sulfureux perturbait le dosage par spectrophotométrie en U V.

Quant au dosage chromatographique, il peut se faire en utilisant, soit une fraction du distillat, soit directement une fraction du vin essayé.

La révélation directe sous lumière UV de $\lambda = 2\,537$ Å est très sensible. Par comparaison avec une gamme étalon, on peut déterminer la dose d'A. S. contenue dans la prise d'essai. Le résultat obtenu est approché, mais la méthode est très simple et rapide.

Reçu pour publication en janvier 1962.

SUMMARY

STUDY OF THE EXTRACTION AND OF THE ASSAY OF SORBIC ACID IN WINE

Paper chromatography was used to determine the characteristics of the extraction of sorbic acid by steam.

The spots of sorbic acid were revealed directly in the ultraviolet at a wavelength of $\lambda = 2\,537$ Å.

The apparatus used for these tests was that of Professor JAULMES. This apparatus must be used under normal working conditions. This means that the part of a 20 ml test dose which is left after obtaining 200 ml of distillate must be of 18 to 20 ml.

Various tests have been performed using test doses of various sizes and various concentrations of sorbic acid.

The distillate was recovered in fractionated amounts of 100 ml., and a chromatography was performed on aliquot quantities of these fractions The chromatographic spots were compared to a scale of standard spots. It was possible to evaluate the amount of sorbic acid in each fraction. Curves were drawn. Then, extraction from various solutions and from various wines was studied.

It was proven that magnesium sulfate increases the speed of extraction.

Finally, a unidimensional method for the direct ascending chromatography of sorbic acid from wine, with revelation in the ultraviolet, is described.

This paper concludes that the general formula for the extraction of a 20 ml test dose is the following :

$$V = f(c,v) \text{ provided, } V/v \geqslant 25 \quad \text{and} \quad c \leqslant 4{,}000 \text{ mcg}$$

in which,

V is the volume of the distillate.

v is the volume of the test dose.

c is the concentration of sorbic acid.

In the research reported by many authors, the V/v volume ratio is far from being equivalent to 25. Under such conditions, the volume of the distillate is too small to contain all of the sorbic acid.

Only PEYNAUD's work appears to fulfill the necessary conditions for complete extraction.

The advantages of direct chromatography from wine are that it is a simple and fast technique and that it does away with previous extraction of sorbic acid by ether or by steam. It is a semi-quantitative method.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Baillot d'Estivaux L., 1959. L'acide sorbique dans la conservation des vins. *Ann. Fals. Fr.*, 149-154.

Barret A., Bidan P., 1960. L'acide sorbique. Essais effectués par l'INRA. *Vignes et Vins*, n° 85, 8-14.

Biol H., Foulonneau Ch., 1961. Recherche sur l'extraction et le dosage de l'acide sorbique dans les vins : *C. R. Acad. Agric.* 957-959.

Chenard P. F., 1960. L'acide sorbique dans la conservation des vins blancs. Mode d'emploi pratique. Dosage dans les vins. *Vignes et Vins*, n° 87, 15-17.

Circulaire du ministère de l'agriculture, 15 octobre 1959. Emploi de l'acide sorbique dans les vins. *Ann. Fals. Fr.*, 486-487.

Florentin D., 1959. Emploi de l'acide sorbique en alimentation. *Ann. Fals. Fr.*, 454-459.

Guimberteau G., Portal E., 1961. Contribution à la recherche de l'acide benzoïque et des acides phénols dans les vins. *Ann. Fals. Fr.*, 330-337.

Hardon H. J., Visser D., 1959. Méthodes colorimétriques de dosage de l'acide sorbique. *Recueil des méthodes d'analyse des vins*. 2e édition. Édité par l'O. I. V.

Jacquin P., 1960. Dosage de l'acide sorbique dans les boissons. *Ann. Technol. agric.*, 393-408.

Jaulmes P., Mestres R., Mandrou B., 1961. Le dosage de l'acide sorbique nécessaire à la correction de l'acidité volatile des vins. *Ann. Pharm. Franç.*, 19-475.

Peynaud E., 1960. L'emploi de l'acide sorbique dans la conservation des vins. *Vignes et vins*, n° 85, 15-17.

Puissant A., 1960. L'acide sorbique vu par la Station Œnologique d'Angers. *Vignes et Vins*, n° 87, 13.

Spanyar P., Sandor A., 1959. Dosage de l'acide sorbique dans les matières alimentaires. *Recueil des méthodes d'analyse des vins*. 2e édition. Édité par l'O. I. V.

Station de recherches viticoles d'Angers, 1960. Essais de conservation des vins doux par l'acide sorbique ou les sorbates. *Vignes et Vins*, n° 89, 35-37.

Sudario E., 1959. Recherche et dosage de l'acide sorbique. *Recueil des méthodes d'analyse des vins*. 2e édition. Édité par l'O. I. V.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (2), 145-151.

EFFET PROTECTEUR DES BOUTEILLES DE VERRE AMBRÉ CONTRE LES PERTES DE RIBOFLAVINE ET DE VITAMINE A DUES A L'EXPOSITION DU LAIT STÉRILISÉ A LA LUMIÈRE

Denise HUGOT, M. LHUISSIER et J. CAUSERET

avec la collaboration technique d'Évelyne BIETTE

Laboratoire d'Études sur la Nutrition,
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine et Oise).

SOMMAIRE

Un lait stérilisé, conditionné en bouteilles de verre blanc ou de verre ambré, est conservé pendant 6 mois à la température de la pièce :

— soit à la lumière solaire, au voisinage des fenêtres d'un local orienté vers le sud ;

— soit à une lumière tamisée, la quantité d'énergie lumineuse reçue par les bouteilles étant vingt fois plus faible que dans le cas précédent ;

— soit dans l'obscurité.

A la lumière tamisée, le verre ambré protège la riboflavine et la vitamine A du lait contre les effets de la lumière. Après 6 mois, la teneur en riboflavine est pratiquement inchangée, et la perte de vitamine A est à peine supérieure à celle qui se produit dans l'obscurité (25 p. 100 au lieu de 20 p. 100).

A la lumière intense, l'effet protecteur du verre ambré s'avère satisfaisant pendant au moins 6 semaines : après ce laps de temps, les pertes atteignent 20 p. 100 seulement pour la riboflavine et à peine 10 p. 100 pour la vitamine A ; dans le même temps, le lait conditionné en bouteilles de verre blanc subit des pertes importantes (riboflavine, 95 p. 100 ; — vitamine A, 70 p. 100).

Il est donc permis de penser que l'emploi de bouteilles de verre ambré pour le conditionnement du lait stérilisé favoriserait le maintien de ses qualités nutritionnelles — ainsi d'ailleurs que de ses qualités organoleptiques — au cours de la conservation.

I. — INTRODUCTION

L'exposition prolongée à la lumière, même diffuse, du lait stérilisé conditionné en bouteilles de verre blanc, provoque, outre une altération du goût, des pertes de vitamines. Ces pertes sont particulièrement rapides dans le cas des deux facteurs vitaminiques principaux du lait : la riboflavine et la vitamine A (CAUSERET et *al.*, 1961).

Malheureusement, il n'est pas toujours possible de maintenir les bouteilles dans l'obscurité. A l'usine, pendant le transport, dans la boutique du détaillant ou au domicile du consommateur, une exposition à la lumière solaire ou artificielle est souvent inévitable.

Dans ces conditions, l'emploi de bouteilles de verre teinté absorbant les radiations du spectre visible responsables de la « saveur de lumière » et des pertes de vitamines, peut apparaître comme une solution séduisante du problème. Cette solution est d'ailleurs largement appliquée dans certains pays pour le conditionnement du lait stérilisé.

Toutefois, s'il est bien établi qu'un verre ambré ou rouge peut retarder l'apparition de saveurs indésirables, il ne semble pas que son effet protecteur contre les pertes vitaminiques du lait stérilisé ait fait l'objet de vérifications expérimentales : les quelques travaux effectués ont porté sur du lait cru ou du lait pasteurisé soumis à l'action de la lumière pendant quelques heures seulement.

STAMBERG et THEOPHILUS (1945) ont exposé à la lumière solaire directe, des bouteilles de verre blanc ou de verre marron foncé (1) de 1 litre contenant du lait pasteurisé homogénéisé. Les résultats suivants sont extraits de leur travail :

	Perte de riboflavine (p. 100)	
	Verre blanc	Verre marron
Après 1 h d'exposition	9,0	0,6
— 2 h —	35,4	4,5
— 3 h —	77,5	5,6

De même, HERREID et *al.* (1952) ont exposé à la lumière solaire directe, du lait pasteurisé homogénéisé, conditionné en bouteilles de verre blanc, de verre ambré ou de verre rouge (2). En 2 heures, la perte de riboflavine atteignait 60 à 80 p. 100 (suivant la saison) avec le verre blanc ; elle était encore nulle après le même laps de temps avec le verre teinté.

A notre connaissance, aucun expérimentateur ne s'est attaché à suivre, dans les mêmes conditions, l'évolution du taux de vitamine A. Le seul travail sur l'effet protecteur du verre teinté a porté sur du lait cru enrichi par addition de 2.000 U.I. de palmitate de vitamine A par « quart » (3) (COX et *al.*, 1957). Conditionné en bouteilles de verre blanc ou de verre ambré, ce lait a été exposé pendant 1 h 1/2 à la lumière solaire directe : sa teneur en vitamine A s'est abaissée de 16 et 9 p. 100 respectivement.

Pour intéressants qu'ils soient, les travaux précédents ne permettent pas de prévoir l'évolution de la valeur vitaminique du lait stérilisé conditionné en bouteilles de verre teinté, en cas d'exposition prolongée à la lumière. Notre étude a donc été entreprise en vue de combler en partie cette lacune.

II. — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Nos recherches ont porté sur l'évolution, au cours de la conservation, de la teneur en riboflavine et en vitamine A d'un lait stérilisé conditionné dans des bouteilles de 1 litre, les unes en verre blanc, les autres en verre ambré.

Une partie de ces bouteilles a été exposée à la lumière, dans des conditions qui seront précisées, tandis que d'autres étaient maintenues dans l'obscurité.

(1) Bouteilles de bière. Aucune précision n'est donnée sur la transmission du verre.

(2) Le verre ambré et le verre rouge utilisés ne transmettent la lumière que pour les longueurs d'onde supérieures respectivement à 450 et 584 mμ.

(3) Quart de gallon (soit 1,14 litre).

Caractéristiques des verres

Les bouteilles de verre ambré utilisées provenaient d'une usine française qui les emploie pour le conditionnement du lait stérilisé.

Le verre de ces bouteilles est épais de 3 à 5 mm. Sa transmission spectrale énergétique a été déterminée en pourcentage (figure 1). Les radiations de longueur d'onde comprise entre 490 et 520 $m\mu$, responsables de la photolyse de la riboflavine (JOSEPHSON, 1946) ne sont transmises que dans une faible proportion (moins de 20 p. 100).

Au contraire, le verre blanc transmet environ 85 p. 100 de la lumière dans toute l'étendue du spectre visible.

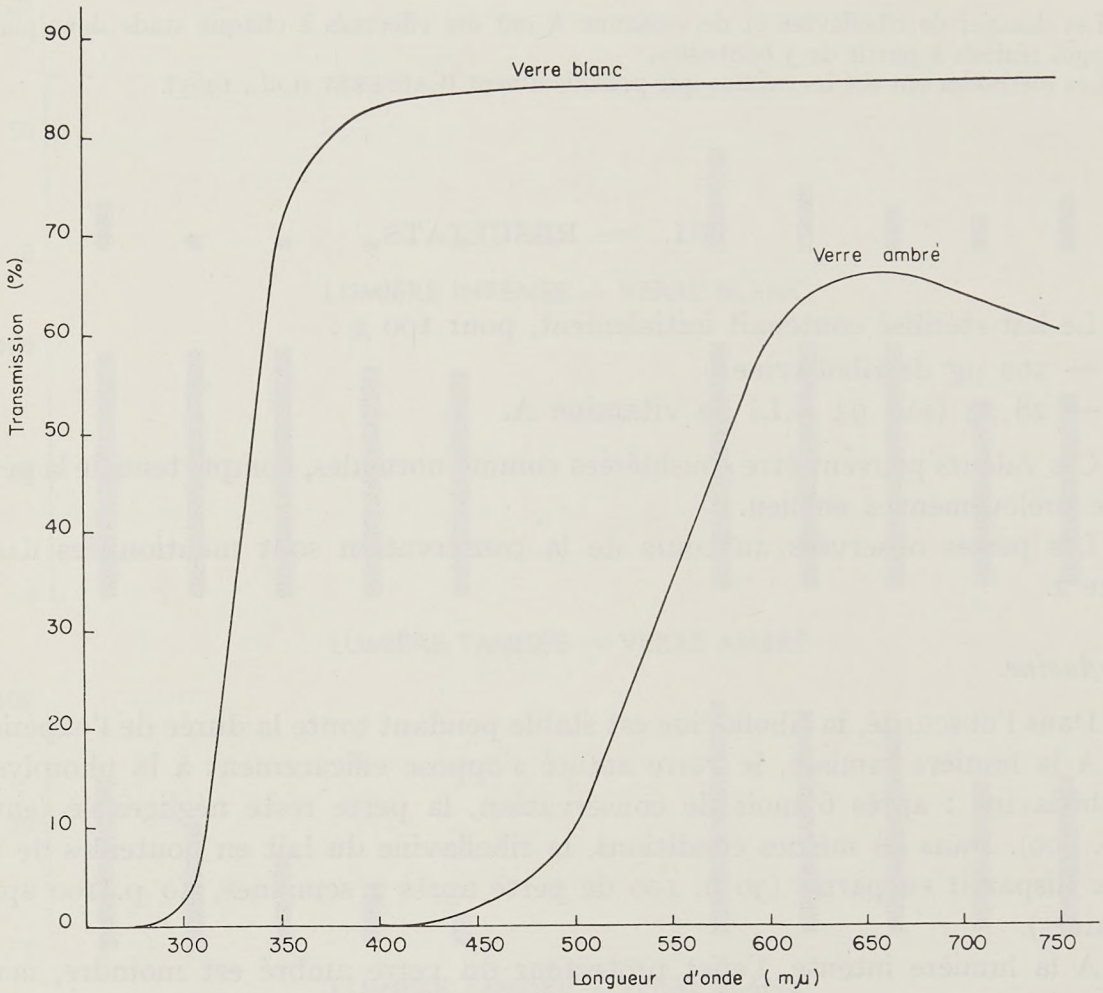


FIG. 1 — *Transmission lumineuse du verre ambré et du verre blanc utilisés*

Caractéristiques du lait stérilisé et conditions de conservation.

Le lait employé provenait d'une usine laitière de la région parisienne. Ce lait avait subi une préstérilisation dans un appareil à ultra-haute température, suivie d'une stérilisation en bouteilles. Pour une description plus précise des traitements appliqués, nous renvoyons le lecteur à notre publication antérieure (CAUSERET et *al.*, 1961).

Les prélèvements ont été effectués le 15 mai 1961, sur 100 bouteilles de verre blanc et 100 bouteilles de verre ambré intercalées dans la même chaîne.

Dix bouteilles de verre ambré et dix de verre blanc ont été utilisées pour les analyses immédiates. Les autres ont été réparties en lots de trente qui ont été entreposés dans des conditions diverses :

— dans un local orienté vers le sud, à un mètre des fenêtres : les bouteilles étaient donc exposées à la lumière solaire directe pendant plusieurs heures chaque jour par beau temps ;

— dans un local orienté également vers le sud et communiquant avec le précédent, mais à

une lumière tamisée au moyen de feuilles de papier sulfurisé placées sur les vitres des fenêtres : dans ces conditions, la quantité de lumière parvenant aux bouteilles était vingt fois plus faible que dans le cas précédent (dans toute l'étendue du spectre visible) ;

— dans le même local, mais dans des emballages étanches à la lumière.

Pendant les premiers mois, la température de ces locaux est restée voisine de + 20°C, mais s'est élevée en été entre + 20° et + 25°C ; pendant quelques semaines de fortes chaleurs, elle a même souvent dépassé + 25°C dans la journée.

Pour tous les lots, des prélèvements de 7 à 8 bouteilles, pour analyses, ont été réalisés à la fin des 2e, 6e, 10e, 16e et 26e semaines.

Méthodes analytiques.

Les dosages de riboflavine et de vitamine A ont été effectués à chaque stade dans plusieurs mélanges réalisés à partir de 3 bouteilles.

Les méthodes ont été les mêmes que précédemment (CAUSERET *et al.*, 1961).

III. — RESULTATS

Le lait stérilisé contenait initialement, pour 100 g :

— 162 µg de riboflavine

— 28 µg (soit 93 U.I.) de vitamine A.

Ces valeurs peuvent être considérées comme normales, compte tenu de la période où le prélèvement a eu lieu.

Les pertes observées au cours de la conservation sont mentionnées dans la figure 2.

Riboflavine.

Dans l'obscurité, la riboflavine est stable pendant toute la durée de l'expérience.

A la lumière tamisée, le verre ambré s'oppose efficacement à la photolyse de la riboflavine : après 6 mois de conservation, la perte reste négligeable (environ 10 p. 100). Dans les mêmes conditions, la riboflavine du lait en bouteilles de verre blanc disparaît en partie (30 p. 100 de perte après 2 semaines, 50 p. 100 après 6 semaines).

A la lumière intense, l'effet protecteur du verre ambré est moindre, mais la perte n'est encore que de 20 p. 100 après 6 semaines. Dans le lait conditionné en bouteilles de verre blanc, la perte atteint déjà 20 p. 100 après 2 semaines, et elle est quasi totale après 6 semaines.

Vitamine A.

Dans l'obscurité, la vitamine A est stable jusqu'à la 10e semaine incluse ; mais, après la 16e et la 26e semaines, on observe des pertes appréciables (15 à 20 p. 100).

A la lumière tamisée, le comportement de la vitamine A est sensiblement le même (pertes de 20 à 25 p. 100) ; la perte supplémentaire due à la lumière est donc négligeable. Avec le verre blanc, la perte n'est que de 10 p. 100 après 6 semaines, mais elle atteint 40 p. 100 après 16 ou 26 semaines.

A la lumière intense, le verre ambré protège mieux la vitamine A que la riboflavine : dans le délai où est consommée la majeure partie de la production de lait

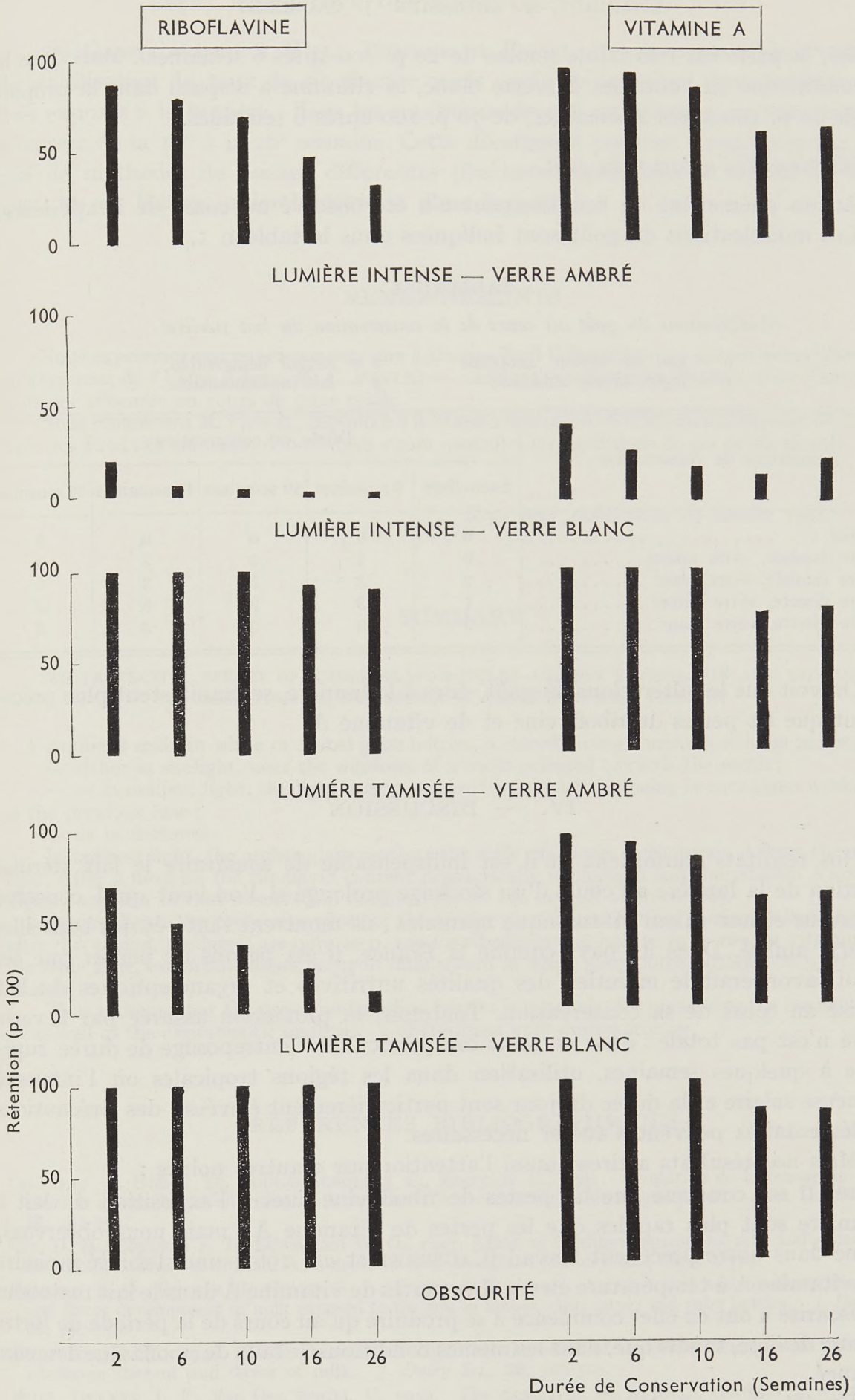


FIG. 2 — *Rétention de la riboflavine et de la vitamine A dans le lait stérilisé conservé à la lumière ou dans l'obscurité (par rapport au taux initial)*

stérilisé, la perte est très faible (moins de 10 p. 100 après 6 semaines). Mais dans le lait conditionné en bouteilles de verre blanc, la vitamine a disparu dans la proportion de 60 p. 100 après 2 semaines, de 70 p. 100 après 6 semaines.

Modifications de l'aspect et du goût.

Aucun phénomène de brunissement n'a été observé au cours de l'expérience. Les modifications du goût sont indiquées dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Modifications du goût au cours de la conservation du lait stérilisé

0 = pas de saveur anormale
1 = légère saveur anormale
2 = saveur désagréable
3 = lait inconsommable

Conditions de conservation	Durée de conservation				
	2 semaines	6 semaines	10 semaines	16 semaines	26 semaines
Obscurité	0	0	0	0	0
Lumière tamisée, verre ambré	0	1	3	3	3
Lumière tamisée, verre blanc	2	3	3	3	3
Lumière directe, verre ambré	1	3	3	3	3
Lumière directe, verre blanc	3	3	3	3	3

On voit que les altérations du goût, dues à la lumière, se manifestent plus précocement que les pertes de riboflavine et de vitamine A.

IV. — DISCUSSION

Nos résultats confirment qu'il est indispensable de soustraire le lait stérilisé à l'action de la lumière au cours d'un stockage prolongé si l'on veut qu'il conserve une saveur et une valeur vitaminique normales ; ils montrent l'intérêt des bouteilles de verre ambré. Dans un pays comme la France, il est permis de penser que cet emploi favoriserait le maintien des qualités nutritives et organoleptiques du lait stérilisé au cours de sa conservation. Toutefois, la protection assurée par le verre ambré n'est pas totale : dans certains cas particuliers (entreposage de durée supérieure à quelques semaines, utilisation dans les régions tropicales où l'intensité lumineuse solaire et la durée du jour sont particulièrement élevées), des précautions supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires.

Mais nos résultats attirent aussi l'attention sur d'autres points :

1°) Il est confirmé que les pertes de riboflavine dues à l'exposition du lait à la lumière sont plus rapides que les pertes de vitamine A ; mais nous observons, comme dans notre précédent travail (CAUSERET et *al.*, 1961) une stabilité moindre de la vitamine A à température élevée. Les pertes de vitamine A dans le lait maintenu à l'obscurité n'ont en effet commencé à se produire qu'au cours de la période de fortes chaleurs de l'été, tandis que, dans les mêmes conditions, le taux de riboflavine demeure inchangé.

En été, il paraît donc préférable d'entreposer le lait stérilisé dans des pièces fraîches.

2°) Contrairement à MIJLL DEKKER et ENGEL (1952), nous n'observons pas de stabilisation du taux de riboflavine après quelques semaines dans les laits stérilisés exposés à la lumière : dans les conditions de nos expériences, ce taux continue à baisser de la 10e à la 26e semaine. Cette divergence pourrait s'expliquer par l'emploi de méthodes de dosage différentes (fluorométrique dans le travail de MIJLL DEKKER et ENGEL, microbiologique dans le nôtre).

REMERCIEMENTS

Nous exprimons nos remerciements aux Laiteries Paul POMMEREAU — et tout particulièrement au Directeur de l'Usine d'Ivry, M. C. PEYLET — ainsi qu'aux Laiteries BRIDEL, pour l'aide qu'ils nous ont procurée au cours de cette étude.

Nous remercions M. VASSAL, Ingénieur à la Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux, d'avoir bien voulu contrôler les conditions de ces prélèvements.

Reçu pour publication en janvier 1962.

SUMMARY

THE PROTECTIVE EFFECT OF AMBER GLASS BOTTLES AGAINST RIBOLFLAVIN AND VITAMIN A LOSSES DUE TO EXPOSITION OF STERILIZED MILK TO LIGHT

A sterilized milk, in white or amber glass bottles, is stored during 6 months at room temperature :

— either in sunlight, near the windows of a room oriented towards the south ;

— or in indirect light, the light energy received by the bottles being twenty times weaker than in the previous case ;

— or in darkness.

In indirect light, the amber glass protects the milk riboflavin and vitamin A from the effect of light. After 6 months, the riboflavin content is practically unchanged and the vitamin A loss is but slightly superior to that observed in darkness (25 p. 100 instead of 20 p. 100).

In intense light, the protective effect of the amber glass is satisfactory during at least 6 weeks ; after this period, the losses are only 20 p. 100 for riboflavin and hardly 10 p. 100 for vitamin A ; in the same time, important losses occur in milk stored in white glass bottles (riboflavin 95 p. 100 — vitamin A 70 p. 100).

Thus it seems that the use of amber glass bottles is beneficial for preserving the nutritive value — as well as the organoleptic qualities — of sterilized milk during storage.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CAUSERET J., HUGOT D., GOULAS-SCHOLLER C., MOCQUOT G., 1961. Évolution de la teneur du lait stérilisé en riboflavine et en vitamine A au cours d'une conservation de longue durée. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 289-299.

COX D. H., COULTER S. T., LUNDBERG W. O., 1957. Effect of nordihydroguaiaretic acid and other factors on stability of added vitamin A in dry and in fluid milk. *J. Dairy Sci.*, **40**, 564-570.

HERREID E. O., RUSKIN B., CLARK G. L., PARKS T. B., 1952. Ascorbic acid and riboflavin destruction and flavor development in milk exposed to the sun in amber, clear paper and ruby bottles. *J. Dairy Sci.*, **35**, 772-778.

JOSEPHSON D. V., 1946. Some observations regarding the effect of various wavelengths of light on the riboflavin content and flavor of milk. *J. Dairy Sci.*, **29**, 508-510.

MIJLL DEKKER L. P., Van Der, ENGEL C., 1952. The vitamin A, B_1, B_2 and C contents of bottled sterilized milk during storage under various conditions. *Netherl. Milk Dairy J.*, **6**, 104-108.

STAMBERG O. E., THEOPHILUS D. R., 1945. Photolysis of riboflavin in milk. *J. Dairy Sci.*, **28**, 269-275.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (2), 153-165.

MISE AU POINT

LES ACIDES GRAS DU BEURRE. CONNAISSANCES ACTUELLES.

Simone KUZDZAL - SAVOIE

Station centrale de Microbiologie et de Recherches laitières, Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise).

I. — Introduction

On a assisté au cours des dernières décades à un développement des études et recherches sur la biochimie des lipides et leur rôle physiologique. Parmi d'autres causes, une hypothèse, formulée par les milieux médicaux — ou introduite dans ces milieux — a certainement contribué à ce développement. Selon cette hypothèse, l'accroissement des cas de maladies cardio-vasculaires dans les pays à haut niveau de civilisation est lié au taux élevé de graisses consommées et à une prédominance, dans l'alimentation, de graisses d'une nature déterminée.

Dans le même temps, les méthodes analytiques classiques de la biochimie des lipides se sont trouvées progressivement renouvelées et remplacées par des méthodes plus modernes d'investigation, faisant appel en premier lieu à des notions de physique moléculaire et de chimie structurale.

Dans la revue actuelle nous ferons le point des découvertes récentes en ce qui concerne la composition de la matière grasse du beurre. Cette matière grasse est formée dans la proportion de 99 p. 100 par des triglycérides, et, c'est aux acides gras constitutifs de ces triglycérides que nous nous attacherons plus spécialement.

Hilditch, dans son livre « The chemical constitution of natural fats », (édition de 1947) établit ainsi la liste des acides gras existant dans la matière grasse du lait de vache : acides gras normaux à nombre pair d'atomes de carbone, saturés de C_4 à C_{20} et insaturés de C_{10} à C_{22}. Parmi ces derniers on trouve les acides monoènes en C_{10}, C_{12}, C_{14}, C_{16} et C_{18}, les acides polyènes en C_{18} (octadécadiénoïque) et C_{20}. On signale la présence d'un acide insaturé en C22 et la présence d'acides isomères de l'acide linoléique (stéréo-isomère et isomère comportant les doubles liaisons en position conjuguée).

Hilditch et ses collaborateurs utilisent principalement la technique de distillation fractionnée pour séparer et identifier les acides gras.

Depuis 1947, cette technique a encore été très largement utilisée dans l'étude des acides gras

du beurre, et grâce à elle et aux perfectionnements qu'ils y ont apportés, SHORLAND et *al.* (1950-1961) et HANSEN et *al.* (1950-1961) en Nouvelle-Zélande, ont découvert de nouveaux acides gras dans la matière grasse du lait de vache.

D'autre part, depuis 1947, des techniques récentes de séparation et d'identification des acides gras ont été appliquées à l'étude de la matière grasse du lait et des produits laitiers. Nous en exposerons brièvement les résultats.

La chromatographie sur papier ou sur colonne en phase normale ou inversée a permis de séparer les acides volatils (HISCOX et BERRIDGE, 1950 ; KEENEY, 1955 ; KEMP et HETRICK, 1958 ; KOSIKOWSKI, 1959) ou les acides à plus longue chaîne, saturés et insaturés (BOLDINGH, 1953 ; KAUFMANN, 1956 ; INOUYE, NODA et HIRAMAYA, 1955 ; STADHOUDERS et MULDER, 1956 ; INOUYE, HIRAYAMA et NODA, 1956) que l'on savait déjà être présents dans la matière grasse du lait.

La chromatographie en phase gazeuse a permis de « découvrir » de nouveaux acides gras et de confirmer l'existence des acides découverts depuis peu par les chercheurs de Nouvelle-Zélande cités plus haut.

Cette technique a déjà été largement appliquée à l'étude des acides gras de la graisse du lait. Citons en premier lieu l'étude approfondie de JAMES et MARTIN (1956) et JAMES, PEETERS et LAURYSSENS (1956) sur le lait de chèvre, puis les nombreux travaux se rapportant aux acides gras du beurre (HAWKE, 1957, ANSELMI, BONIFORTI et MONACELLI, 1960 ; PATTON, 1960 ; NILSSON, 1960 ; WOLFF, 1960 ; FRANCESCO et AVANCINI, 1961 ; SMITH, 1961 ; KUZDZAL-SAVOIE et PAQUOT, 1962). L'étude des produits formés, ou libérés, au cours de l'affinage des fromages a été également abordée par cette technique (NILSSON, 1960). Par ailleurs, la chromatographie en phase gazeuse a apporté des informations sur la composition de la fraction à haut point de fusion de la graisse du lait (PATTON et KEENEY, 1958 ; THOMPSON, BRUNNER et STINE, 1959), sur la structure et la synthèse des glycérides du lait (HAAB, SMITH et JACK, 1959 ; MCCARTHY, PATTON et ÉVANS, 1960 ; PATTON et al., 1960 ; AST et VANDER WAL, 1961) et sur quelques autres problèmes particuliers (SAMUELS et al., 1960 ; de MAN, 1961).

La spectrométrie d'absorption en lumière ultraviolette a permis le dosage des acides gras ployinsaturés du beurre (acides « essentiels » et isomères de position), sans séparation préliminaire. On trouvera dans deux publications récentes KUZDZAL-SAVOIE et KUZDZAL (1961 *a*, 1961 *b*) les références bibliographiques se rapportant à cette question. Il y a lieu d'ajouter le travail très important de REINART et NESBITT (1956) sur les laits du Manitoba.

La spectrométrie infrarouge, plus récente, a été utilisée pour l'étude des isomères géométriques des acides insaturés monoènes et polyènes (SMITH et JACK, 1954 ; CORNWELL et *al.*, 1959).

La diffraction des rayons X a été appliquée à l'étude des acides gras à longue chaîne (SHORLAND et *al.*, HANSEN et *al.*, 1950-1961).

Nos connaissances concernant les acides gras du beurre se sont donc considérablement accrues depuis 1947. Nous nous proposons d'en faire le point, celui-ci étant certainement très provisoire puisque les possibilités des techniques que nous venons de citer, en particulier, celles de la chromatographie en phase gazeuse, sont loin d'être atteintes.

II. — LES ACIDES GRAS DU BEURRE ACTUELLEMENT CONNUS ET LEURS PROPORTIONS RELATIVES

Les proportions relatives des différents acides gras de la matière grasse du lait ou du beurre sont essentiellement variables. Cependant ces variations (dans la mesure où nous les connaissons) restent limitées de telle sorte que le caractère spécifique de la matière grasse du lait de vache est constamment maintenu.

A. — *Acides saturés*

1. — *A chaîne normale (droite)*

a) *A nombre pair d'atomes de Carbone.*

Les acides de C^4 à C^{20} sont bien connus et ont été isolés et identifiés de longue date à partir de la matière grasse du lait. Dans le tableau 1, nous reproduisons, en nous limitant aux acides à nombre pair d'atomes de carbone, les résultats d'une analyse publiée par HILDITCH (1947) et effectuée sur un lait de mélange provenant d'un troupeau de vaches en pâture dans le Cheshire (Angleterre) au début de l'été.

TABLEAU 1 [1]

Acides saturés normaux à nombre pair d'atomes de carbone (de C_4 à C_{20}) (en pourcentage des acides totaux, p/p)

C_4 butyrique	C_6 caproïque	C_8 caprylique	C_{10} caprique	C_{12} laurique	C_{14} myristique	C_{16} palmitique	C_{18} stéarique	comme C_{20} arachidique
—	—	—	—	—	—	—	—	—
3,7	1,7	1,0	1,9	2,8	8,1	25,9	11,2	1,2

Les teneurs ne sont indiquées qu'à titre d'exemple. On sait en effet qu'en fonction principalement des changements du régime alimentaire des vaches laitières (STADHOUDERS et MULDER, 1955 ; KUZDZAL-SAVOIE et KUZDZAL, 1962) ces teneurs varient. Mais cependant dans toutes les analyses de beurre on retrouve le schéma général indiqué dans le tableau 1.

On remarque dans le tableau 1 l'expression « comme arachidique » utilisée par HILDITCH en 1947 pour indiquer que l'identification des composants de la fraction supérieure des acides gras du beurre n'était pas résolue à l'époque. En 1959, HANSEN, SHORLAND et COOKE, ont sépcialement étudié cette fraction et ont isolé et identifié non seulement l'acide arachidique, acide saturé en C_{20}, mais aussi les acides saturés béhénique, lignocérique et cérotique respectivement en C_{22}, C_{24} et C_{26}. Les proportions suivantes (en pourcentage du total des acides gras) ont été trouvées : 0,21 pour l'acide en C_{20} et, respectivement, 0,07, 0,04 et 0,06 pour les suivants.

Parmi les acides saturés à nombre pair d'atomes de carbone et de bas poids moléculaire, un acide en C_2 a été signalé (HAWKE, 1957) dans la matière grasse de lait de vache. La présence de cet acide n'a pas été confirmée ultérieurement (SMITH, 1961).

b) *A nombre impair d'atomes de carbone.*

— Acides inférieurs à C_7.

En 1961, AST et VANDER WAL signalèrent la présence à l'état de traces des acides en C_3 et C_5 dans la matière grasse d'un beurre industriel (beurre d'hiver). Ces acides, propionique et valérique, n'avaient pas été trouvés en 1956 par JAMES, PEETERS et LAURYSSENS dans le lait de vache. Cependant l'acide valérique a été trouvé dans le lait de chèvre (JAMES et MARTIN, 1956).

En 1961, de MAN a révélé la présence sur un aérogramme d'acides gras du beurre, de trois pics précédant le pic de l'acide caproïque. L'un correspond à l'acide butyrique mais les deux autres n'ont pu être attribués, selon l'auteur, ni à l'acide propionique, ni à l'acide acétique, ni à l'acide isobutyrique.

Quelques obscurités existent donc encore concernant les acides à bas poids moléculaire contenus dans la matière grasse du beurre.

[1] Tiré de HILDITCH (1947) p. 115.

— Acides de C_7 à C_{23}.

A l'exception des acides en C_{21} et C_{23} signalés et identifiés par HANSEN, SHORLAND et COOKE (1959), les acides impairs de C_7 à C_{19} inclus ont été trouvés dans le beurre par divers auteurs travaillant séparément. Les uns signalent seulement leur présence, d'autres indiquent une teneur.

Toutes ces informations sont rassemblées dans le tableau 2. Les acides impairs ont été généralement séparés et identifiés par la technique de chromatographie en phase gazeuse. Certains d'entre eux, cependant, ont été isolés et identifiés par d'autres méthodes.

TABLEAU 2

Acides saturés normaux à nombre impair d'atomes de C

Nombre d'atomes de carbone	Nom de l'acide	Référence	Teneur
C_7	*n*-heptanoïque	JAMES, PEETERS et LAURYSSENS, 1956.	Traces
		AST et VANDER WAL, 1961.	Traces
C_9	*n*-pélargonique	JAMES, PEETERS et LAURYSSENS, 1956.	0,25 (% ac. insol., p/p).
		PATTON, 1960.	0,01 (% est. méthyl., p/p).
		AST et VANDER WAL, 1961.	Traces.
C_{11}	*n*-undécanoïque	HANSEN, SHORLAND et COOKE.	Présence.
		JAMES, PEETERS et LAURYSSENS, 1956.	0,52 (% ac. insol., p/p).
		SAMUELS et *al.*, 1960.	0,4 (% éluat total).
		PATTON, 1960.	0,03-0,05 (% est. méthyl. p/p).
		AST et VANDER WAL, 1961.	0,24 (% ac. tot., p/p).
C_{13}	*n*-tridécanoïque	SHORLAND, GERSON et HANSEN, 1955*a*.	0,03 (% ac. tot., p/p).
		JAMES, PEETERS et LAURYSSENS, 1956.	0,75 (% ac. insol., p/p).
		SAMUELS et *al.*, 1960.	Traces.
		PATTON, 1960.	0,06-0,09 (% est. méthyl., p/p).
		AST et VANDER WAL, 1961.	0,2 (% ac. tot., p/p).
		SMITH, 1961.	0,2 (moles %).
C_{15}	*n*-pentadécanoïque	SHORLAND, GERSON et HANSEN, 1955*b*.	0,82 (% ac. tot., p/p).
		JAMES, PEETERS et LAURYSSENS, 1956.	1,15 (% ac. insol., p/p).
		PATTON, 1960.	1,0-1,1 (% est. méthyl., p/p).
		SAMUELS et *al.*, 1960.	1,6 (% éluat total).
		AST et VANDER WAL, 1961.	1,1 (% ac. tot., p/p).
		SMITH, 1961.	1,0-1,2 (moles %).
C_{17}	*n*-heptadécanoïque (margarique)	HANSEN, SHORLAND et COOKE, 1951.	1,0 (% ac. tot., p/p).
		JAMES, PEETERS et LAURYSSENS, 1956.	1,3 (% ac. insol., p/p).
		PATTON, 1960.	0,7 (% est. méthyl., p/p).
		SAMUELS et *al.*, 1960.	0,8 (% éluat total).
		AST et VANDER WAL, 1961.	1,0 (% ac. tot., p/p).
		SMITH, 1961.	0,7-0,8 (moles %).
C_{19}	*n*-nonadécanoïque	HANSEN, SHORLAND et COOKE, 1959.	Présence.
		AST et VANDER WAL, 1961.	0,28 (% ac. tot., p/p).
C_{21}	*n*-héneicosanoïque	HANSEN, SHORLAND et COOKE, 1959.	0,05 (% ac. tot., p/p).
C_{23}	*n*-tricosanoïque	HANSEN, SHORLAND et COOKE, 1961.	0,06 (% ac. tot., p/p).

2. — *Acides saturés à chaîne ramifiée.*

Rappelons que les acides à chaîne ramifiée comportent le long de la chaîne un ou plusieurs groupes méthyle. L'acide est « iso », si le groupe méthyle est sur le carbone occupant la pénultième position et il est « anteiso », si le groupe méthyle est sur le carbone occupant l'antépénultième position.

Le tableau 3 donne la liste des acides saturés à chaîne ramifiée trouvés dans la matière grasse de lait de vache ainsi que les teneurs indiquées par les auteurs.

Lorsque les analyses ont été faites par la technique de chromatographie en phase gazeuse, l'appellation « iso » attribuée à tel ou tel acide représenté par un pic peut paraître parfois un peu hâtive. La plupart des auteurs qui ont utilisé cette technique s'accordent d'ailleurs pour considérer

TABLEAU 3

Acides saturés à chaîne ramifiée

Nombre d'atomes de carbone	Référence	Teneur
C_4 ou C_5	Ast et Vander Wal, 1961.	traces
C_9	James, Peeters et Lauryssens, 1956.	0,08 (% ac. insol. p/p)
C_{10}	—	0,03 (% ac. insol. p/p)
C_{11}	—	0,65 (% ac. insol. p/p)
C_{12}	—	0,10 (% ac. insol. p/p)
C_{13}	—	0,95 (% ac. insol. p/p)
C_{14}	—	2,2 (% ac. insol. p/p)
	Samuels et *al.*, 1961	traces
	Smith, 1961	0,1 (moles %)
	Ast et Vander Wal, 1961.	0,17 (% ac. total p/p)
C_{15}	James, Peeters et Lauryssens, 1956.	1,74 (% ac. insol. p/p)
	Ast et Vander Wal, 1961	1,38 (% ac. total p/p)
C_{16}	James, Peeters et Lauryssens, 1956.	0,28 (% ac. insol. p/p)
	Samuels et *al.*, 1960.	0,4 (% éluat total)
	Smith, 1961.	0,1-0,2 (moles %)
C_{17}	James, Peeters et Lauryssens, 1956.	2,46 (% ac. insol. p/p)
	Smith, 1961	0,8-0,9 (moles %)
C_{18}	James, Peeters et Lauryssens, 1956.	6,8 (% ac. insol. p/p)
	Smith, 1961.	0,3-0,5 (moles %)

l'appellation comme « probable » plutôt que comme « démontrée » (James, Peeters et Lauryssens, 1956 ; Ast et Vander Wal, 1961 ; Smith, 1961). Certains auteurs (Thompson, Brunner et Stine, 1959 ; Patton et *al.*, 1960 ; Anselmi, Boniforti et Monacelli, 1960 ; Francesco et Avancini, 1961) présentent des aérogrammes excellents sur lesquels apparaissent bien les mêmes pics que d'autres attribuent aux acides à chaîne ramifiée, mais ils n'interprètent pas ces pics. Le manque de rigueur que l'on ne peut s'empêcher de relever dans l'identification de certains acides ramifiés par chromatographie en phase gazeuse peut en partie expliquer les fortes différences constatées dans les teneurs indiquées. Les modes d'expression variables utilisés augmentent encore la confusion. Shorland et son école, sans l'aide de la chromatographie en phase gazeuse, (tout au moins dans les travaux se rapportant aux premiers acides ramifiés), ont réellement isolé et identifié par des méthodes rigoureuses un certain nombre d'acides ramifiés dont ils ont pu donner la formule exacte en précisant notamment la position du groupe méthyle.

Le tableau 4 présente l'ensemble des travaux de l'école de Shorland sur les acides ramifiés isolés de la matière grasse du beurre.

TABLEAU 4

Acides saturés ramifiés du beurre
(selon SHORLAND *et coll.)*

Nombre d'atomes de carbone	Nom de l'acide	Référence	Teneur
13	(+) 10-méthyl dodécanoïque (anteiso)	SHORLAND, GERSON et HANSEN, 1955*b*	0,01 (% ac. tot. p/p)
	11-méthyl dodécanoïque (iso)	—	0,05 (% ac. tot. p/p)
14	12-méthyl tridécanoïque	HANSEN, SHORLAND et COOKE, 1954*b*	traces
15	(+) 12-méthyl tétradécanoïque (anteiso)	HANSEN, SHORLAND et COOKE, 1954*a* SHORLAND, GERSON et HANSEN, 1955*a*	0,43 (% ac. tot. p/p)
	13-méthyl tétradécanoïque (iso)	—	0,37 (% ac. tot. p/p)
17	14-méthyl hexadécanoïque (anteiso)	HANSEN et SHORLAND, 1951*a*	présence
	15-méthyl hexadécanoïque (iso)	—	présence
18	10-méthyl heptadécanoïque	HANSEN, SHORLAND et COOKE, 1951	traces
20	multiramifié	HANSEN et SHORLAND, 1951*b* HANSEN et SHORLAND, 1953.	traces

Signalons l'existence d'un acide en C_{20} multiramifié (comportant 3 ou 4 groupes méthyle répartis le long de la chaîne (HANSEN et SHORLAND, 1951 b, 1953).

B. — *Acides insaturées*

Ces acides comportent, le long de la chaîne, une double liaison (acides monoènes) ou plusieurs doubles liaisons (acides polyènes ou polyinsaturés). L'existence d'une double liaison crée des possibilités d'isomérie géométrique (configuration *cis* ou *trans*) et d'isomérie de structure (position conjuguée ou non conjuguée des doubles liaisons).

Il convient, pensons-nous, de considérer les acides isomères comme de véritables acides individuels, entités possédant des propriétés propres. En effet l'isomérie modifie considérablement les propriétés physiques et chimiques des acides insaturés et par voie de conséquence du beurre qui les contient. Ainsi l'isomère *trans* d'un acide insaturé possède une structure plus « étendue » plus encombrante » que l'isomère *cis* ; cette structure donne plus de cohésion au composé, plus de rigidité. Corrélativement, le point de fusion de l'isomère *trans* d'un acide gras est nettement plus élevé que celui de l'isomère *cis*.

1. — *Acides monoènes*

L'acide monoène le plus connu est certainement l'acide oléique qui se trouve en quantité importante dans la matière grasse du beurre. Citons, à titre d'exemple, la proportion de 32,8 p. 100 des acides totaux (*p/p*), obtenue au cours de la même analyse que celle partiellement reportée dans le tableau 1.

D'autres acides monoènes ont été identifiés dans le beurre. Le tableau 5 donne la liste de ces différents acides monoènes ainsi que les teneurs indiquées par les auteurs.

TABLEAU 5

Acides insaturés monoènes à chaîne droite

Nombre d'atomes de carbone	Nom de l'acide	Place double liaison	Config. stéréo-chimique	Référence	Teneur
10	*Décénoïque*	9 : 10	*cis*	Hilditch, 1947.	0,1 (% ac. tot., p/p)
				Hansen et Shorland, 1952.	0,2 (moles %)
				Patton et *al.*, 1960.	
				Anselmi, Boniforti et Monacelli, 1960.	
				Smith, 1961.	0,4-0,7 (moles %)
12	*Dodécénoïque*	9 : 10	*cis*	Hilditch, 1947.	0,2 (% ac. tot. p/p)
				Hansen et Shorland, 1952.	0,2 (moles %)
				James, Peeters et Laurys-sens, 1956.	0,38 (% ac. insol. p/p)
				Patton et *al.*, 1960.	
				Smith, 1961.	0,2 (moles %)
14	*Tétra-décénoïque* (ou myristo-léique)	9 : 10	*cis*	Hilditch, 1947.	0,6 (% ac. tot. p/p)
				Hansen et Shorland, 1952.	0,8 (moles %)
				James, Peeters et Laurys-sens, 1956.	2,2 (% ac. insol. p/p)
				Hawke, 1957.	2,0 (moles %)
				Samuels et *al.*, 1960.	1,6 (% éluat total)
				Patton et *al.*, 1960.	
				Anselmi, Boniforti et Monacelli, 1960.	
				Ast et Vander Wal, 1961.	0,24 (% ac. tot.)
				Smith, 1961.	1,8-1,9 (moles %)
16	*Hexa-décénoïque* (ou palmito-léique)	9 : 10	*cis*	Hilditch, 1947.	3,4 (% ac. tot. p/p)
				Hansen et Shorland, 1952.	1,8 (moles %)
				James, Peeters et Laurys-sens, 1956.	3,12 (% ac. insol. p/p)
				Hawke, 1957.	1,66 (moles %)
				Samuels et *al.*, 1960.	3,0 (% éluat total)
				Patton et *al.*, 1960.	0,9-1,3 (% est. méthyl p/p)
				Ast et Vander Wal, 1961.	3,53 (% ac. tot. p/p)
				Smith, 1961.	2,5-2,8 (moles %)
		9 : 10	*trans*	Backderf et Brown, 1958.	0,4 (% ac. tot. p/p)
				Scott et *al.*, 1959.	
17	*Hepta-décénoïque*	9 : 10	*cis*	Hansen, Shorland et Cooke, 1960.	0,06 (% ac. tot. p/p)
18	*Octa-décénoïque*				
	— oléique	9 : 10	*cis*	Hilditch, 1947.	32,8 (% ac. tot. p/p)
	isomère	?	*cis*	Shorland et Hansen, 1957.	
	— vaccénique	11 : 12	*trans*	Brouwer et Jonker-Scheffe-ner, 1946.	1,3-5,0 (% graisse)
				Cornwell et *al.*, 1953.	5,0-9,7 (% ac. tot. p/p)
				Patton, 1960.	2,5-6,4 (% est. méthyl p/p)
	isomère	?	*trans*	Cornwell et *al.*, 1953.	
20	*Eicosénoïque*	?	?	Shorland et Johannesson, 1951.	
22	*Docosénoïque*				

On note l'existence d'un acide monoène à nombre impair d'atomes de carbone : acide *cis* 9, heptadécénoïque, isolé par HANSEN, SHORLAND et COOKE (1960).

Les acides monoènes présentés dans le tableau 5, à l'exeption de l'acide vaccénique, comportent la double liaison en 9 : 10. Il convient cependant de noter avec SHORLAND et HANSEN (1957) que l'existence d'autres acides insaturés isomères *cis* n'est pas exclue.

2. — *Acides polyènes ou polyinsaturés.*

L'étude de ces acides a été poursuivie essentiellement, au cours des dernières années, par la spectrométrie en ultraviolet. Cependant la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie infrarouge ont, elles aussi, permis d'accroître nos connaissances dans ce domaine. En fait ces différentes méthodes se complètent plutôt qu'elles ne se superposent. Si la méthode spectrométrique en ultraviolet permet de doser les acides à 2, 3, 4, 5 et même 6 doubles liaisons en position conjuguée ou non, elle n'apporte que peu d'information concernant la longueur de chaîne ou la place de la double liaison.

La chromatographie en phase gazeuse permet, au contraire, d'estimer le nombre d'atomes ; mais on ne peut par cette méthode distinguer les acides insaturés conjugués des nons conjugés. Enfin la spectrométrie infrarouge a permis essentiellement d'établir l'existence d'isomères géométriques.

Il résulte de l'emploi prépondérant de la technique spectrométrique en ultraviolet une certaine imprécision sur la structure réelle de certains des acides polyinsaturés. En particulier l'acide diène conjugué du beurre n'a pas été isolé jusqu'à maintenant et sa structure n'a pu être encore déterminée avec rigueur.

Dans le tableau 6, on présente un classement des acides polyènes du beurre dosés par spectrométrie en ultraviolet et étudiés du point de vue de leur configuration stéréochimique par spectrométrie infrarouge.

TABLEAU 6

Acides polyènes (ou polyinsaturés) du beurre
Détermination par spectrométrie ultra-violette
(Teneurs exprimées en g p. 100 g de matière grasse)

Nature des polyènes	Position des doubles liaisons	Configuration stéréochimique	Teneurs	Cf. références
Diènes	Conjuguée	cis-trans trans-trans	0,4-2 à 3	(1) SMITH, 1960. KUZDZAL-SAVOIE et KUZDZAL, 1961.
	Non conjuguée (dont ac. linoléique)	cis-cis cis-trans trans-trans	1,0-1,5	CORNWELL et *al.*, 1953. REINART et NESBITT, 1956.
Triènes	Conjuguée	?	0,010-0,030	mêmes réf. qu'en (1)
	Non conjuguée (dont ac. linolénique)	cis-cis-cis	0,5-1,0 à 1,5	et SHORLAND, 1950.
Tétraènes	Conjuguée	?	0,002-0,003	mêmes réf. qu'en (1) et
	Non conjuguée (dont ac. arachidonique)	toute cis	0,3-0,4	SHORLAND et HANSEN, 1957. BOSWORTH et SISSON, 1934.
Pentaènes	Non conjuguée	toute cis	0,1	CORNWELL et *al.*, 1953. SHORLAND et JOHANNESSON, 1951. MATTSSON et SWARTLING, 1958.
Hexaènes	Non conjuguée		traces	SHORLAND et JOHANNESSON, 1951.

On ne peut par ces méthodes, du moins dans l'état actuel de nos connaissances, déterminer la formule exacte des acides dosés. On admet cependant que l'acide tétraène non conjugué comporte 20 atomes de carbone et que l'acide hexaène mis en évidence par SHORLAND et JOHANNESSON (1951), en comporte 22. Selon ces derniers auteurs ces acides en C_{20} et C_{22} peuvent aussi être monoènes, dièmes, triènes, tétraènes et pentaènes.

L'acide dième non conjugué du beurre n'est pas en totalité identique à l'acide linoléique *cis-cis* puisque les isomères *cis-trans* et *trans-trans* ont été trouvés par différents auteurs (SMITH et JACK, 1954 ; SCOTT et *al.*, 1959). Selon SAMBASIVARAO (1960) l'acide linoléique ne représenterait qu'environ 70 p. 100 (65-73) de cet acide dième non conjugué. D'autre part, on a mis en évidence par chromatographie en phase gazeuse, des acides dièmes à 14 et 16 atomes de carbone. Les teneurs suivantes ont été indiquées : 0,27 p. 100 des acides insolubles (JAMES, PEETERS et LAURYSSENS, 1956) et 0,45 p. 100 des acides totaux (*p/p*) (AST et VANDER WAL, 1961), pour l'acide en C_{14} et, 1,17 p. 100 des acides insolubles, (*p/p*) (JAMES, PEETERS et LAURYSSENS, 1956) et 0,41 p. 100 des acides totaux, (*p/p*) (AST et VANDER WAL, 1961) pour l'acie en C_{16}. Ces acides dièmes se placent-ils, dans l'analyse spectrométrique, parmi les dièmes conjugués ou parmi les dièmes non conjugués? Nos connaissances actuelles ne nous permettent pas, croyons-nous, de répondre à cette question.

Par ailleurs, on pensait jusqu'à maintenant avoir le droit de parler indistinctement de l'acide triène non conjugué du beurre ou de l'acide linolénique. En effet, l'identité de ces deux acides avait été établie par SHORLAND (1950). Or, en 1960, SAMBASIVARAO montre que 71 à 79 p. 100 seulement de l'acide octadécatriénoïque trouvé dans un beurre d'été est bien de l'acide linolénique. L'acide triène du beurre étant de configuration toute *cis* (SCOTT et *al.*, 1959) on est en droit de se demander quelle est la nature de la fraction octadécatriénoique non conjuguée et non linolénique du beurre ?

En ce qui concerne l'identification de l'acide tétraène non conjugué du beurre à l'acide arachidonique, une forte probabilité existe, depuis les travaux de BOSWORTH et SISSON (1934), renforcés récemment par les travaux de SCOTT et *al.* (1959) indiquant une configuration toute *cis* de l'acide tétraène non conjugué du beurre ; mais, en toute rigueur, l'identité de l'un avec l'autre n'a pas été définitivement établie. Certains auteurs (REINART et NESBITT, 1956 ; KUZDZAL-SAVOIE et KUZDZAL 1961 *a*) utilisant la méthode de dosage des acides polyènes par spectrométrie dans l'ultraviolet n'ont pas calculé séparément les acides pentaènes. Si ces acides pentaènes sont dosés dans les conditions de l'analyse leur taux « gonfle » le taux des tétraènes qui se trouve ainsi un peu plus élevé que le taux réel.

III. — SIGNIFICATION BIOLOGIQUE DES ACIDES GRAS DU LAIT

Au total on compte, selon HERB (1960), une soixantaine d'acides gras dans la matière grasse du beurre.

On a tendance à considérer cette matière grasse comme plus complexe que d'autres graisses d'origine végétale ou animale. Est-ce bien exact? Cette opinion ne serait-elle pas simplement le reflet des très nombreuses investigations dont la matière grasse du lait a été l'objet ces dernières années ?

Quelles leçons tirer, au point de vue fondamental et au point de vue pratique, de la « complexité » de la matière grasse du lait de vache, qu'il s'agisse d'un caractère spécifique propre à cette matière grasse ou d'un caractère commun à toutes les graisses naturelles?

1. — *Origine des acides gras du lait.*

On sait que l'origine des acides gras du lait est double : la glande mammaire en synthétise un certain nombre et elle en prélève d'autres dans le sang qui l'irrigue.

a) *Activité de synthèse de la glande mammaire.*

On sait que la glande mammaire des ruminants est capable de synthétiser les acides gras à nombre pair d'atomes de carbone de C_4 à C_{16} (inclus) par élongation de l'homologue inférieur (additions successives de molécules en C_2). Le point de départ est constitué par les acides volatils résultant de la dégradation des hydrates de carbone et des protéines dans le rumen. Parmi ces acides volatils, le principal est l'acide acétique. On comprend ainsi que les principaux acides saturés du lait des ruminants soient les acides à nombre pair d'atomes de carbone, le plus important en quantité étant l'acide palmitique en C_{16}.

A côté de l'acide acétique, on trouve dans le rumen, de l'acide propionique, de l'acide butyrique et divers acides. Si l'addition des molécules d'acétate se fait non plus à partir de l'acide acétique mais à partir de l'acide propionique (comme JAMES, PEETERS et LAURYSSENS (1956) l'ont démontré), les acides saturés à nombre impair d'atomes de carbone représentent le résultat de cette synthèse.

ANNISON, cité par SHORLAND et HANSEN (1957) signale parmi les acides volatils du rumen (d'un mouton nourri au foin) la présence des acides isobutyrique, isovalérique, 2-méthylbutyrique et valérique. Les acides isovalérique et 2-méthylbutyrique peuvent provenir de l'action des microorganismes du rumen sur des acides aminés tels que la leucine et l'isoleucine (SHORLAND et HANSEN, 1957). Si ces acides ramifiés, isovalérique et 2-méthylbutyrique constituent le point de départ d'une synthèse par élongation on peut expliquer l'origine des acides ramifiés supérieurs iso et antéiso.

b) *Activité de « prélèvement » de la glande mammaire*

On sait qu'on retrouve dans la matière grasse du lait de vache un taux élevé du ou des acides gras constituants prépondérants de la graisse ingérée par l'animal.

α) *Passage simple*

Il peut s'agir d'un simple passage de l'acide gras considéré (compte non-tenu de la structure glycéridique).

Nous citerons par exemple le passage de l'acide laurique dans la matière grasse du lait produit par des vaches recevant un supplément d'alimentation sous forme de tourteaux de coprah non délipidés (KUZDZAL-SAVOIE et PAQUOT, 1962). L'existence dans la matière grasse du lait d'acides à haut poids moléculaire (acides béhénique, lignocérique et cérotique) (HANSEN, SHORLAND et COOKE, 1959) s'explique de la même manière. Ces acides sont en effet des constituants normaux des lipides de l'herbe.

β) *Passage après modification*

Un important phénomène d'hydrogénation, au niveau du rumen sous l'action des microorganismes a été mis en évidence par SHORLAND, WEENINK et JOHNS (1955).

Selon ce phénomène, les acides très insaturés, tels les acides linoléique et linolénique des lipides de l'herbe sont hydrogénés en acide stéarique ou en monoène (oléique). Simultanément, comme au cours de toute hydrogénation, on observe la formation d'isomères *trans* (monoènes et dièmes) et d'isomères (principalement dièmes) conjugués. Les dièmes conjugués augmentent en effet dans le beurre lors de l'introduction d'herbe dans l'alimentation des vaches laitières (STADHOUDERS et MULDER, 1955 ; KUZDZAL-SAVOIE et KUZDZAL, 1961 *b*) de même d'ailleurs que les acides stéarique et oléique (STADHOUDERS et MULDER, 1956 ; KUZDZAL-SAVOIE et KUZDZAL, 1962).

Étude particulière du C_{18} monoène.

L'origine de l'acide oléique de la matière grasse du lait n'est pas encore parfaitement établie. On sait que l'acide oléique (*cis*-9 octadécénoïque) peut provenir de la désaturation de l'acide stéarique. Cette interconversion entre l'acide saturé et l'acide insaturé serait aussi applicable aux autres monoènes en 9 : 10 (*cis*) (FAVARGER, 1959). Mais une part importante, (voisine de 18 p. 100 selon CORNWELL *et al.*, 1953), du monoène en C_{18} du beurre est constitué (BACKDERF et BROWN, 1958) par un acide isomère de position et isomère géométrique de l'acide oléique : l'acide vaccénique dont la double liaison est en 11 : 12 ce qui le distingue de l'acide élaïdique dont la double liaison est en 9 : 10. D'une part l'acide vaccénique n'existerait pas dans les lipides de l'herbe (BROUWER et JONKER-SCHEFFENER,

1946) ; d'autre part, étant de configuration *trans*, pourrait-il provenir de la désaturation de l'acide stéarique? Ne serait-il pas plutôt formé au cours de l'hydrogénation des acides insaturés de l'herbe? Il serait intéressant de mieux connaître la composition des acides gras de l'herbe. Nous avons récemment (travaux non publiés) mis en évidence dans les acides gras du ray-grass (*Lolium perenne*) d'autres acides que ceux signalés par SHORLAND, WEENINK et JOHNS (1955).

2. — *Organisation des acides gras dans la matière grasse du lait de vache*

Tous les acides gras que nous avons énumérés sont des éléments constitutifs des triglycérides, y compris les acides à nombre impair d'atomes de carbone et les acides ramifiés (SHORLAND et HANSEN, 1957).

D'après les travaux récents de McCARTHY, PATTON et EVANS (1960) confirmés par ceux de AST et VANDER WAL (1961), la distribution des acides gras dans les chaînes des triglycérides ne se fait pas au hasard, ou tout au moins pas complètement au hasard. On trouve en effet une proportion plus élevée d'acides insaturés dans les chaînes externes que dans les chaînes internes. Cette structure est établie par l'action de la lipase pancréatique qui libère spécifiquement les acides des chaînes externes. Des résultats obtenus au cours de l'étude de la lipolyse dans certains fromages (BEJAMBES, SAVOIE et CLUZEL, 1952) conduisent à penser que la lipase du lait ou certaines lipases bactériennes agiraient de façon analogue.

3. — *Les acides gras du beurre et la notion « d'acides essentiels »*

Le lait est en premier lieu l'aliment du jeune, aliment indispensable à la vie et suffisant pour assurer cette vie. La matière grasse du lait, qui constitue près du tiers de la substance sèche de cette sécrétion joue-t-elle le même rôle que celui de n'importe quelle autre matière grasse? Ou bien la matière grasse du lait — et à plus forte raison celle du colostrum — possède-t-elle des propriétés spécifiques qui lui confère la qualité de matière grasse indispensable?

Dans l'état actuel de nos connaissances concernant les « acides essentiels » il semble que l'on soit arrivé à une notion plus étroite de l'acide « indispensable » (LE BRETON et FERRET, 1959), le seul acide gras vraiment « indispensable » étant l'acide linoléique (*cis* 9, *cis* 12 octadiécadénoïque). Or, le taux de cet acide dans la matière grasse du beurre n'est encore établi que d'une façon approximative. D'autre part la quantité d'acide linoléique réellement « indispensable » est-elle actuellement définie ainsi que le taux de cet acide dans la ration? Quantité et taux doivent-ils varier avec l'espèce animale considérée?

Autant de questions auxquelles il sera sans doute possible de répondre prochainement. En effet de nombreuses recherches sont actuellement entreprises dans ce domaine.

Reçu pour publication en janvier 1962

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNISON E. F., 1954. Some observations on volatile fatty acids in the Sheep's Rumen. *Biochem. J.*, **57**, 400-404.

ANSELMI S., BONIFORTI L., MONACELLI R., 1960. Analisi cromatografica delle sostanze grasse in fase di vapore. *Boll. Lab. Chim. prov.*, **11**, 317-330.

AST A. J., VANDER WALL R. J., 1961. The structural components of milk triglycerides. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **38**, 67-69.

BACKDERF R., BROWN J., 1958. Further contributions to the nature of monoethenoic fatty acids of butterfat. *Arch. Bioch. Biophys.*, **76**, 15-22.

BEJAMBES M., SAVOIE S., CLUZEL S., 1952. Étude de certaines modifications de la graisse au cours de la maturation de divers types de fromages. *Ann. I. N. R. A., série E., Technol.*, **1**, 23-30.

BOLDINGH J., 1953. The separation of fatty acids by chromatography. *International Colloquium. Biochemical problems. of Lipids, Brussels*, 64.

BOSWORTH A. W., SISSON E. W., 1934. Arachidonic acid in butterfat. *J. Biol. Chem.*, **107**, 489-496.

BROUWER E., JONKER-SCHEFFENER M. C. E., 1946. Vaccenic acid in butterfat and the fluctuations in its amount. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **65**, 408-412.

MC CARTHY R. D., PATTON S., EVANS L., 1960. Structure and synthesis of milk fat. II. Fatty acid distribution in the triglycerides of milk and other animal fats. *J. Dairy Sci.*, **43**, 1196-1201.

CORNWELL D., BACKDERF R., WILSON C., BROWN J., 1953. The trans-octadecenoic acid content of butterfat. *Arch. Biochem. Biophys.*, **46**, 364-375.

FAVARGER P., 1959. Le mode d'élongation des acides gras supérieurs. *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, **21**, 97-115.

FRANCESCO F., AVANCINI D., 1961. La sofisticazione del burro con grassi transesterificati. *Latte*, **35**, 799-817.

HAAB W., SMITH L. M., JACK E. L., 1959. Countercurrent distribution of milk fat triglycerides. *J. Dairy Sci.*, **42**, 454-467.

HANSEN R. P., SHORLAND F. B., 1951 *a*. The branched-chain fatty acids of butterfat. I. — The isolation from butterfat of branched-chain fatty acids with special reference to the C_{17} acids. *Biochem. J.*, **50**, 207-210.

HANSEN R. P., SHORLAND F. B., 1951 *b*. The branched-chain fatty acids butterfat. II. — The isolation of a multibranched C_{20} saturated fatty acid fraction. *Biochem. J.*, **50**, 358-360.

HANSEN R. P., SHORLAND F. B., 1952. Seasonal variations in fatty acid composition of New Zealand, butterfat. *Biochem. J.*, **52**, 207-216.

HANSEN R. P., SHORLAND F. B., 1953. The branched-chain fatty acids of butterfat. III — Further investigations on a multibranched C_{20} saturated fatty acid fraction. *Biochem. J.*, **55**, 662-663.

HANSEN R. P., SHORLAND F. B., COOKE N. J., 1951. The occurrence in butterfat of a C_{18} methyl branched-chain saturated fatty acid. *Chem. Ind.*, 839-840.

HANSEN R. P., SHORLAND F. B., COOKE N. J., 1954 *a*. The branched-chain fatty acids of butterfat. IV — The isolation of (+) -12-methyltetradecanoic acid and of 13-methyltetradecanoic acid. *Biochem. J.*, **57**, 297-301.

HANSEN R. P., SHORLAND F. B., COOKE N. J., 1954 *b*. The branched-chain fatty acids of butterfat. V. — The isolation of 12-methyltridecanoic acid. *Biochem. J.*, **58**, 358.

HANSEN R. P., SHORLAND F. B., COOKE N. J., 1955. The occurrence of *n*-undecanoic acid in butterfat *Chem. Ind.*, 92.

HANSEN R. P., SHORLAND F. B., COOKE N. J., 1957. Occurrence in butterfat of *n*-heptadecanoic acid (margaric acid). *Nature*, **179**, 98.

HANSEN R. P., SHORLAND F. B., COOKE N. J., 1959. Isolation acid identification of the high molecular weight saturated fatty acids of butterfat. *J. Dairy Res.*, **26**, 190-195.

HANSEN R. P., SHORLAND F. B., COOKE N. J., 1960. The isolation of cis 9 heptadecenoic acid from butterfat. *Biochem. J.*, **77**, 64.

HAWKE J. C., 1957. The fatty acids butterfat and the volatile acids formed on oxidation. *J. Dairy Res.*, **24**, 336-371.

HERB S. F., 1960. 34th fall meeting of Am. Oil Chem. Soc. New York (cité par SMITH, 1961).

HILDITCH T. P., 1947. The chemical constitution of natural fats. Chapman et Hall. Londres.

HISCOX E. R., BERRIDGE N. J., 1950. Use of paper partition chromatography in the identification of the volatile fatty acids. *Nature*, **166**, 522.

INOUYE Y., NODA M., HIRAYAMA O., 1955. Paper chromatography of unsaturated fatty acid esters as their mercuric acetate addition compounds. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **32**, 132-135.

INOUYE Y., HIRAYAMA O., NODA M., 1956. Separation and identification of fatty acids. XXI. Paper chromatography of fatty acids as their p. bromophenacyl ester derivatives. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 200-205.

JAMES A. T., MARTIN A. J. P., 1956. Gas liquid chromatography : the separation and identification of the methyl esters of saturated and unsaturated acids from formic acid to *n*-octadecanoic acid. *Biochem. J.*, **63**, 144-152.

JAMES A. T., PEETERS, LAURYSSENS M., 1956. The metabolism of propionic acid. *Biochem. J.*, **64**, 726-732.

KAUFMANN H. P., 1956. Die Papier-chromatographie auf dem Fett-Gebiet XIX : Die quantitative Papier-chromatographische Bestimmung von geradkettigen Fettsäuren und ihren Gemischen. *Fette-Seifen-Anstrichmittel-Die Ernährungs-industrie*, **58**, 492-498.

KEENEY M., 1956. A survey of united states butterfat constants. II. Butyric acid. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **39**, 212-225.

KEMP A. R., HETRICK J. H., 1958. A chromatographic technique for the estimation of some of the free fatty acids in lipolysed dairy products. *J. Dairy Sci.*, **41**, 1494.

KOSIKOWSKI F. V., 1959. Free volatile fatty acids in homogenized raw milk. *Intern. Dairy Cong., London*, **3**, 1545-1551.

KUZDZAL-SAVOIE S., KUZDZAL W., 1962. Variations observées dans les proportions relatives des acides gras du lait de vache, pendant la période de mise à l'herbe. *Congr. Intern. Lait. Copenhague*, 1962. (sous presse).

KUZDZAL-SAVOIE S., PAQUOT C., 1962. Chromatographie en phase gazeuse et lipochimie. III. Identification d'un beurre de constitution anormale. *Ann. Fals. Exp. Chim.* (sous presse).

KUZDZAL-SAVOIE S., KUZDZAL W., 1961 *a*. Influence de la mise à l'herbe des vaches laitières sur les indices de la matière grasse du beurre et sur les teneurs en différents acides gras poly-insaturés. *Ann. Biol. Anim Bioch. Biophys.*, **1**, 47-69.

KUZDZAL-SAVOIE S., KUZDZAL W., 1961 *b*. Les acides poly-insaturés du beurre. Influence de la saison. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 73-80.

LE BRETON E., FERRET S., 1959. Quelques aspects actuels du problème des acides gras indispensables et essentiels. La notion des familles d'acides polyinsaturés et ses conséquences. *Expos. annu. Biochim. méd.*, **21**, 135-168.

MAN J. M. De, 1961. Gas chromatography of the short-chain fatty acids of milk fats. *Milchwissenschaft*, **16**, 245-247.

MATTSSON S., SWARTLING P., 1958. Note on the spectrophotometric determination of polyunsaturated fatty acids in butter. *Report n°* 55. *Dairy Department of the Alnarp Institute, Suède.*

NILSSON R., 1960. Gas kromatografi, en ny analysmetod niom mejerikemin. *Swenska Mejeritidningen* **52**, 605-611.

PATTON S., 1960. Gas chromgatraphico analysis of milk fat. *J. Dairy Sci.*, **43**, 1350-1354.

PATTON S., Mc CARTHY R. D., EVANS L., LYNN T. R., 1960. Structure and synthesis of milk fat. I. Gas chromatographic analysis. *J. Dairy Sci.*, **43**, 1187-1195.

PATTON S., KEENEY P. G., 1958. The high-melting glyceride fraction from milk fat. *J. Dairy Sci.*, **41**, 1288-89 (Technical note).

REINART A., NESBITT J. M., 1956. The unsaturated fatty acid content of milk fat in Manitoba. *XIV^e Cong. Intern. Lait., Rome*, **1**, 911-924.

SAMBASIVARAO K., 1960. The nature of the octadecadienoic et octadecatrienoic acids of summer butterfat. *Diss. Abst.*, **21**, 1047. (Cité dans *D. S. A.*, **23**, 1135).

SAMUELS E. R., COFFIN A., JULIEN J. P., BAKER B. E., 1960. Studies on milk powders. IV. The foam and sediment fractions of reconstituted whole milk. *J. Dairy Sci.*, **43**, 624-629.

SCOTT W. E., HERB S. F., MAGIDMAN P., RIEMENSCHNEIDER R. W., 1959. Unsaturated fatty acids of butter fat. *J. Agric. Food Chem.*, **7**, 125-129.

SHORLAND F. B., 1950. C_{18} unsaturated acids of butterfat. *Nature*, **166**, 745.

SHORLAND F. B., WEENINK K., JOHNS A., 1955. Effect of the rumen on dietary fat. *Nature*, **175**, 1129

SHORLAND F. B., HANSEN R. P., 1957. The minor fatty acid constituents of butterfat. A review. *D. S. A.*, **19**, 168-189.

SHORLAND F. B., JOHANNESSON D. L., 1951. C_{20-22} Unsaturated acids of butterfat. *Nature*, **168**, 75.

SHORLAND F. B., GERSON I., HANSEN R. P., 1955 *a*. The branched-chain fatty acids of butterfat. VII. Further investigations on the C_{15} saturated acids. *Biochem. J.*, **59**, 350.

SHORLAND F. B., GERSON I., HANSEN R. P., 1955 *b*. The branched-chain fatty acids of butterfat. VI. Investigation of the C_{13} acids. *Biochem. J.*, **61**, 702.

SMITH L. M., 1951. Quantitative fatty acid analysis of milk fat by gas liquid chromatography. *J. Dairy Sci.*, **44**, 607-622.

SMITH L. M., JACK E., 1954. The unsaturated fatty acids of milk fat. III. Geometrical isomerism. *J. Dairy Sci.*, **37**, 399-406.

STADHOUDERS J., MULDER H., 1955. The composition of dutch butterfat. I. Seasonal variations in the unsaturated fatty acid composition of butterfat. *Neth. Milk Dairy J.*, **9**, 182-193.

STADHOUDERS J., MULDER H., 1956. The composition of dutch butterfat. II. Seasonal variations in the saturated fatty acid composition of butterfat. *Neth. Milk Dairy J.*, **10**, 53-59.

THOMPSON M. P., BRUNNER J. R., STINE C. M., 1959. Characteristics of high melting triglyceride fractions from the fat globule membrane and butter oil of bovine milk. *J. Dairy Sci.*, **42**, 1651-1658.

WOLFF J. P., 1960. Application de la chromatographie en phase vapeur au contrôle de la pureté des beurres *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **53**, 318-323.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (2), 167-174.

MISE AU POINT

L'HYDROXYMÉTHYLFURFURAL DANS LES JUS DE RAISIN, FORMATION ET MÉTHODES DE DOSAGE

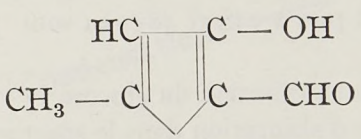
Yvonne COLLON

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude).

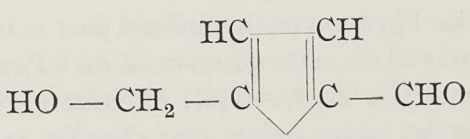
I. — Introduction

Le méthyl-5 formyl-2 furane, ou méthylol-5 méthylal-2 cyclooxatétracarbadiène 2-4, ou oxyméthylfurfurol, ou 5-hydroxyméthylfurfural (en abrégé dans le texte : 5-HMF), a été décelé pour la première fois par Düll en 1895.

En chauffant à 120°C une solution aqueuse de saccharose ou de fructose contenant 0,3 p. 100 d'acide oxalique, Kiermayer (1895) nota la formation d'acide lévulinique et celle, intermédiaire, d'une substance possédant un noyau furanique et dont il établit la formule développée :



La formule exacte de ce composé fut déterminée par Van Ekenstein et Blanskma (1910). Elle est la suivante :



L'hydroxyméthylfurfural que l'on peut déceler dans les jus de fruits est susceptible de se former au cours de la dégradation thermique des sucres ; c'est aussi un produit intermédiaire de la réaction de Maillard.

II. — Modes de formation de l'hydroxyméthylfurfural

1. — *Dégradation thermique de sucres*

L'hydroxyméthylfufural prend naissance au cours du chauffage des hexoses, dans certaines conditions, et en présence d'un acide provoquant, par déshydratation, la cyclisation de l'ose et la genèse du noyau furanique.

Haworth et Jones (1944) obtinrent ce corps avec un rendement de 27 p. 100 en opérant de la façon suivante :

— Une solution aqueuse à 30 p. 100 de saccharose était traitée par l'acide oxalique en solution aqueuse à 0,3 p. 100 sous pression, à 120°-140°C pendant 2 à 5 heures.

Seule la fraction fructose de la molécule donnait naissance à l'hydroxyméthylfurfural, ce qui était démontré par oxydation, par l'acide nitrique, du résidu obtenu après séparation de l'hydroxyméthylfurfural.

On peut expliquer ceci par le fait que la moitié fructose de la molécule de saccharose est initialement sous forme furanique, et que, dans les conditions acides du milieu, il y a équilibre entre les formes furanique et pyranique.

Signalons toutefois que les mêmes auteurs ont obtenu de l'hydroxyméthylfurfural à partir du glucose après traitement préalable de la solution aqueuse de ce dernier par un alcali.

Les travaux de Montgommery et Wiggins (1951) montrèrent par la suite que l'acide oxalique n'était pas indispensable car, dans la solution sucrée chauffée sous pression, il se forme de l'acétol qui libère des ions H^+ catalysant la dégradation du sucre. Ces auteurs obtinrent l'hydroxyméthylfurfural avec un rendement de 22 p. 100 en chauffant sous pression, à 160°C, une solution à 30 p. 100 de saccharose.

Wolfrom (1948) note que lorsque une solution aqueuse de D-glucose, de pH initial 6,5 préparée à partir d'eau distillée trois fois était chauffée sous réfrigérant à reflux, il se produisait une série de modifications dans le spectre d'absorption U V de cette solution. Au bout de 3 heures et demie il obtenait une bande distincte à 228 mμ. Après 8 heures de chauffe, une seconde bande apparaissait à 285 mμ.

Si on ajuste le pH initial à 4,3 par addition d'acide chlorhydrique, et que l'on chauffe à reflux, on obtient une série de courbes identiques, mais plus rapidement. Ceci démontre que le mécanisme de la réaction de formation de l'hydroxyméthylfurfural à partir du D-glucose est indépendant du pH initial, tout au moins dans l'intervalle de pH considéré (6,5 à 2,0). Mais par contre, la vitesse de la réaction dépend de l'acidité du milieu. Cette vitesse de transformation augmente quand l'acidité augmente.

Wolfrom a noté, en outre, que l'intensité de l'absorption à 228 mμ atteint son maximum au bout de 16 heures, lorsque les deux pics à 228 et 285 mμ sont présents. Elle décroît ensuite si l'on prolonge la réaction.

Volsken (1954), signale que la stérilisation du glucose en vue de son utilisation comme plasma sanguin fait apparaître une bande d'absorption dans le spectre U V de cette solution. Cette bande d'absorption est absente avant la stérilisation.

2. — *Réaction de Maillard*

Nous avons dit plus haut que l'hydroxyméthylfurfural peut se former au cours de la réaction de Maillard. Un très important travail sur cette question est dû à Petit (1959).

La réaction de brunissement non enzymatique, dite réaction de Maillard (1912), se produit chaque fois que des protides ou des acides aminés sont chauffés en présence de sucres réducteurs ou même sont simplement maintenus en leur présence à température ordinaire pendant des temps, suffisamment longs. Elle est donc d'une très grande généralité, et peut intervenir, à des degrés divers, en laboratoire comme en usine, au cours de toutes les opérations de chauffage ou de stockage de matériel biologique.

En Technologie, elle est tenue pour responsable, au moins en partie, des modifications de coloration, d'arôme et de caractères organoleptiques survenant à différents stades de la préparation et du stockage de nombreuses substances alimentaires : jus de fruits, produits sucrés, malts, bières, poudres de lait, viandes et poissons séchés, croûte de pain, etc.

Hodge (1953) propose un schéma général de la réaction.

D'après cet auteur, dans un premier stade, donnant des composés non absorbants dans le visible et le proche U V, sucre et aminoacide réagissent pour donner un composé de condensation avec élimination d'eau.

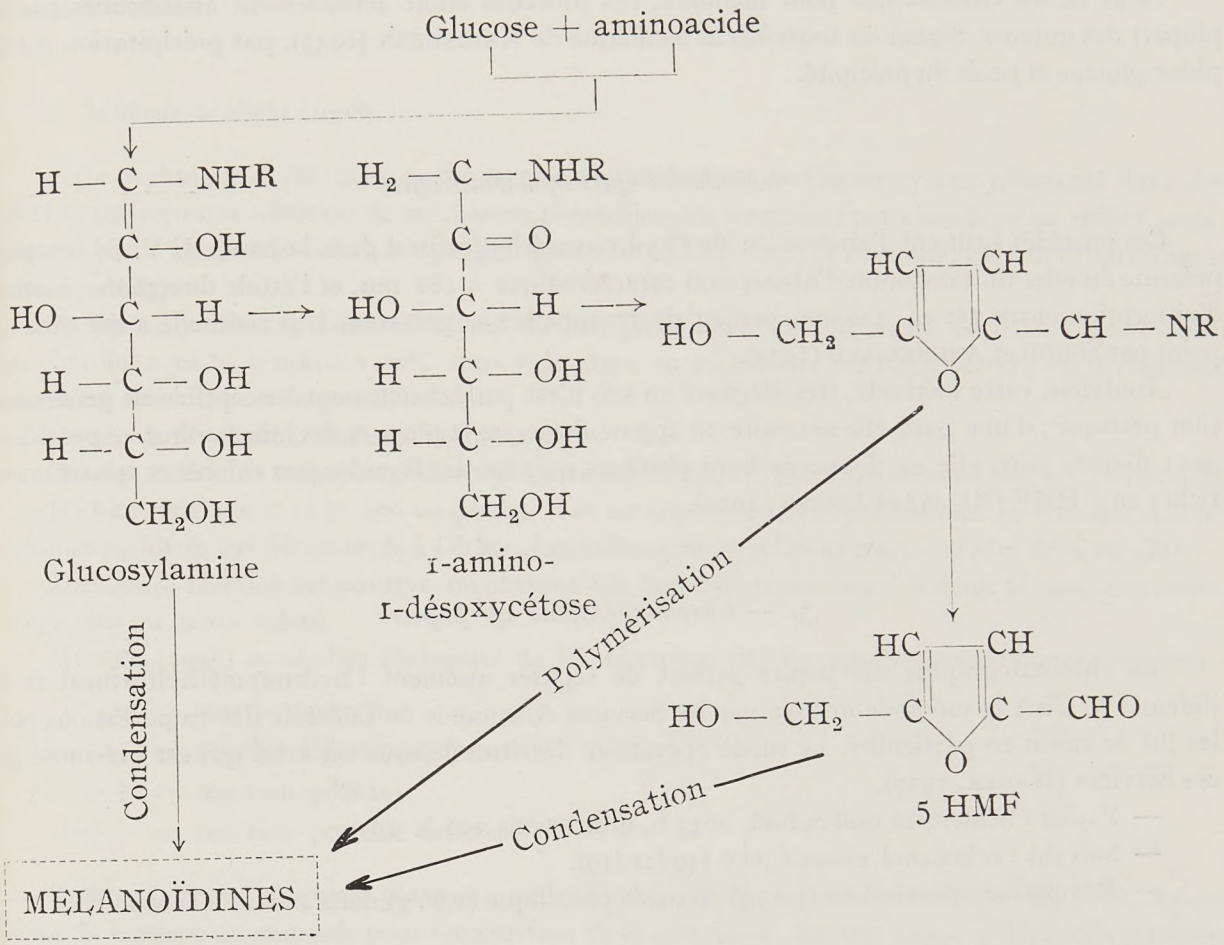
Dans le cas du glucose, c'est la glucosylamine, ou son produit de réarrangement de AMADORI, qui s'accumulerait dans le milieu sous forme énolique.

Ces deux produits, glucosylamine et produit de réarrangement de AMADORI, ont été isolés et identifiés.

La réaction peut alors se poursuivre suivant deux schémas qui conduisent tous deux aux polymères fortement colorés dans le visible, puis aux mélanoïdines insolubles.

En réalité, les produits formés au cours des différentes étapes coexistent dans le milieu.

Le schéma général de la réaction est le suivant :



PATRON (1951), dans sa thèse publiée aux États-Unis, donne un schéma sensiblement identique de la réaction de MAILLARD.

3. — *Inhibition de la réaction de Maillard*

On sait que l'anhydride sulfureux inhibe le brunissement des jus. Il est probable que cette inhibition est due à la stabilisation des produits intermédiaires de la réaction. On ne connaît pas toutefois le mécanisme de cette inhibition. Cette connaissance serait très importante, car elle permettrait de réaliser au mieux le sulfitage.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce mécanisme :

— En premier lieu, on a pensé que le bisulfite formait avec le sucre une combinaison bisulfitique, la chaîne de réactions étant ainsi bloquée dès son origine.

— Une autre hypothèse suppose que le même type de blocage pourrait intervenir sur le groupement aldéhydique du 5-HMF. Mais des travaux de PETIT (1959), il ressort qu'il est peu vraisemblable que la réaction de MAILLARD soit bloquée à ce niveau ; l'inhibition pourrait jouer sur un composé intermédiaire, encore hypothétique.

Remarquons que l'anhydride sulfureux joue ici un double rôle : inhibiteur du brunissement, il protège les jus ; augmentant l'acidité du milieu, il favorise la formation de l'hydroxyméthylfurfural.

II. — Méthodes proposées pour la recherche et le dosage du 5-HMF

Les méthodes proposées pour la recherche et le dosage de l'hydroxyméthylfurfural peuvent être classées en quatre groupes :

1. — *Méthodes pondérales*

Nous ne les citerons que pour mémoire, ces procédés étant actuellement abandonnés par la plupart des auteurs. Signalons toutefois la technique de Kruisheer (1935), par précipitation par la phloroglucine et pesée du précipité.

2. — *Méthodes spectrophotométriques*

Ces procédés utilisent l'absorption de l'hydroxyméthylfurfural dans la bande U V. Ce composé présente en effet un maximum d'absorption caractéristique à 282 mμ, et l'étude directe des courbes d'absorption entre 250 et 320 mμ permet de reconnaître sa présence. Une méthode a été mise au point par Schou et Abildgaard (1934).

Toutefois, cette méthode, très élégante en soi, n'est pas actuellement susceptible de généralisation pratique ; d'une part, elle nécessite un appareillage que la plupart des laboratoires ne possèdent pas ; d'autre part, elle ne donne de bons résultats qu'avec des liquides peu colorés et relativement riches en 5-HMF (Melitz et Drews, 1959).

3. — *Chromatographie sur papier*

La chromatographie sur papier permet de séparer aisément l'hydroxyméthylfurfural et de l'identifier. C'est la méthode utilisée par les Services Allemands de Contrôle des Importations pour les jus de raisin en particulier. Le mode opératoire décrit ci-dessous est celui qui est préconisé par ces Services (Weger, 1957).

— Papier : Schleicher und Schüll, 2043 b, dimensions 200 × 190.
— Solvant : n-butanol /éthanol /eau (40 /11 /19).
— Révélateur : p-anisidine (1,23 g) + acide phtallique (1,66 g) dans 100 ml d'éthanol.

Mode opératoire.

On met 10 à 20 microlitres du jus à étudier pour chaque spot de départ. On laisse monter toute une nuit. (Signalons que personnellement nous avons toujours obtenu une bonne séparation en 7 heures 30, à 20°C). Le chromatogramme, grossièrement séché, mais encore humide, est porté, pendant 10 à 15 minutes, dans une enceinte contenant HCl concentré, puis révélé sur les deux faces avec le mélange p-anisidine + acide phtallique, et remis à nouveau 5 minutes en atmosphère chlorhydrique. Une tache jaune, de R_F voisin de 0,82, fluorescent en jaune en lumière de Wood, indique la présence de l'hydroxyméthylfurfural. Selon Melitz et Drews (1959), la quantité limite décelable par la chromatographie sur papier est voisine de 0,4 γ, ce qui, avec un spot de départ de 20 microlitres, correspond à une teneur de 20 mg par litre.

Hogl (1951) utilise le papier Whatmann n° 1, de dimensions 200 × 210, le développement étant de 9 à 10 heures à 20°C, avec le même solvant que ci-dessus. Le chromatogramme est ensuite séché aux infrarouges pendant 30 à 60 minutes, puis révélé avec une solution de naphtorésorcine dans l'acide trichloracétique. Par séjour à l'étuve à 95-100°C pendant 5 minutes, les spots correspondants à l'hydroxyméthylfurfural apparaissent rouges. Ce procédé a l'avantage de supprimer le passage en atmosphère chlorhydrique, mais la coloration est moins stable que celle obtenue par le premier procédé.

4. — *Méthodes colorimétriques*

Elles font appel à la propriété de l'hydroxyméthylfurfural de donner des réactions colorés avec de nombreux réactifs : résorcine chlorhydrique, aniline, en milieu acétique ou chlorhydrique, l'acide anthranilique, la p-toluidine, pour ne citer que les principales.

Parmi ces méthodes, nous nous sommes plus spécialement arrêtés sur celle de FIEHE, qui a déjà fait l'objet de nombreux travaux, et sur celle de WINKLER. Les modes opératoires en sont donnés ci-dessous.

a) *Méthode de Fiehe* (1908).

Cette technique a été mise au point pour la recherche de l'hydroxyméthylfurfural dans des miels ayant reçu une addition de saccharose préalablement interverti par chauffage en milieu acide. Elle est basée sur la coloration rouge que donne le 5 HMF avec la résorcine chlorhydrique (SELIWANOFF, 1887).

On agite, pendant 5 minutes, 20 ml de jus, préalablement débarrassé de toute trace d'alcool par chauffage au bain-marie à 50°C sous vide, avec 10 ml d'éther purifié (MICHEL, 1945), dans une ampoule à décantation de 50 ml.

On sépare les deux phases par décantation.

Dans une série de tubes à essai, on place 10 ml de réactif (solution de résorcine à 1 p. 100 dans l'acide chlorhydrique à 25 p. 100 en poids), puis on superpose avec précautions les extraits éthérés précédents, filtrés sur filtres lavés à l'éther. Les tubes sont bouchés et placés à l'abri de la lumière.

Lorsque la réaction est positive, on observe à la limite de séparation des deux phases, un anneau rouge plus ou moins coloré.

MICHEL (1945) symbolise l'intensité de la coloration par les signes conventionnels suivants :

O = réaction négative
\+ = réaction légèrement positive
++ = réaction positive
+++ = réaction positive intense.

Telle qu'elle est proposée par son auteur, cette méthode est assez imprécise. En effet, aucune limite de temps n'est imposée pour l'apparition de la coloration. MICHEL (1945) indique que le témoin doit être négatif au bout de 24 heures, mais ne précise rien en ce qui concerne l'essai.

Norberto ESPINOSA (1959) estime que la coloration *rouge cerise* qui doit apparaître dans les 5 *minutes* peut seule être considérée comme positive. Des colorations, même rosâtres, qui mettent plus de 5 minutes à apparaître, ne doivent pas être prises en considération.

La méthode de FIEHE est difficilement utilisable comme méthode de dosage de l'hydroxyméthylfurfural. Tel n'est d'ailleurs pas son but. Elle nécessite en effet une extraction préalable à l'éther qui entraîne des pertes inacceptables quand il s'agit de doser des traces de ce constituant. De plus, selon SCHADE et coll. (1958), il faut au moins 175 γ par ml d'hydroxyméthylfurfural pour que la coloration soit proportionnellle à la concentration.

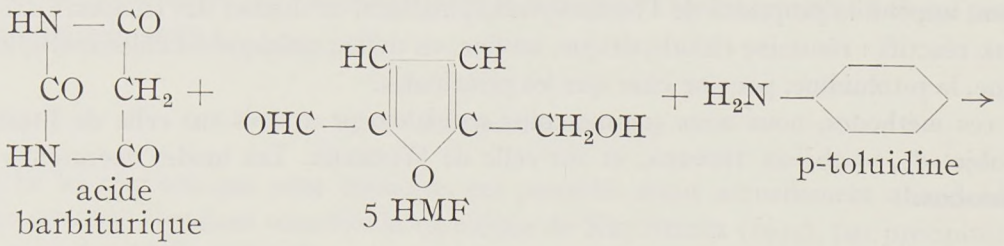
Pour HADORN et KOVACS (1960) qui l'utilisent pour la recherche de 5 HMF dans les miels, elle n'est pas sûre pour des teneurs inférieures à 5 mg p. 100.

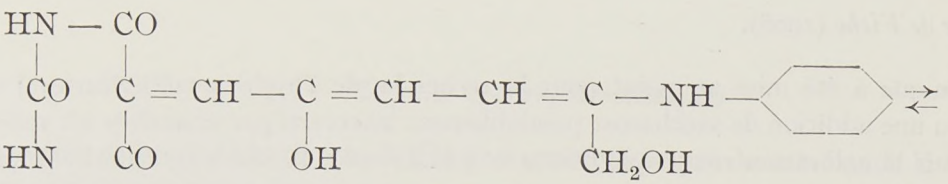
AMERINE (1948), pour un essai uniquement qualitatif, opère de façon un peu différente avec du vin :

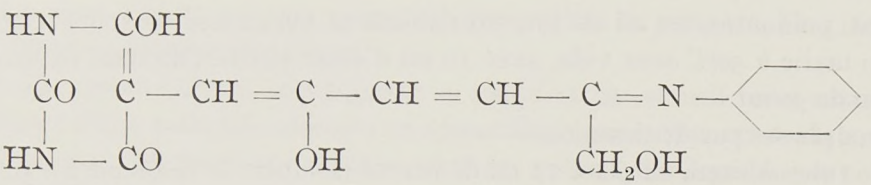
— 10 ml de vin sont traités deux fois avec 10 ml d'éther anhydre dans une ampoule à décantation. L'extrait est évaporé dans une capsule de porcelaine à température ambiante. On ajoute alors 5 ml d'acide chlorhydrique à 30 p. 100 en poids et 2 ml de réactif fraîchement préparé contenant 1 g de résorcine dans 100 ml d'acide chlorhydrique concentré.

b) *Méthode de Winkler* (1955),

Elle utilise la propriété de l'hydroxyméthylfurfural de donner des colorations avec l'acide barbiturique après réaction avec la p-toluidine.La réaction se fait suivant le schéma ci-dessous :







On obtient ainsi une coloration rouge cerise, qui atteint son maximum au bout de 3 ou 4 minutes, et peut, pendant cet intervalle de temps, être utilisée pour la détermination photocolorimétrique du 5 HMF.

Le mode opératoire est le suivant :

Réactifs utilisés : Solution de p-toluidine : 10 g de p-toluidine sont dissous dans environ 50 ml d'isopropanol. On ajoute 10 ml d'acide acétique glacial et complète à 100 avec de l'isopropanol.

La solution se conserve mal et prend rapidement une teinte ambrée. Il est prudent de la renouveler chaque jour.

— Solution de malonylurée (acide barbiturique) : 0,5 g de malonylurée séchée à 100°C sont ajoutés à environ 70 ml d'eau distillée. On chauffe doucement au B.-M. pour faciliter la dissolution et on complète à 100.

Mode opératoire : A 2 ml de jus ou de concentré redilué (10 ml de concentré dilué à 50 avec de l'eau distillée), on ajoute 5 ml de solution de p-toluidine, puis 1 ml de solution d'acide barbiturique. *Exactement 3 minutes après l'addition de l'acide barbiturique,* on fait la lecture photocolorimétrique.

La courbe d'étalonnage est construite à partir d'une solution de 5 HMF pur (origine : FLUKA ou SCHUDARDT).

Mais les solutions de 5 MHF sont fragiles. TURNERS et coll. (1954) signalent que des solutions de 5 HMF restées à température ambiante pendant plusieurs jours donnent des courbes d'absorption montrant la formation d'acide lévulinique, produit de dégradation de l'hydroxyméthylfurfural. Au bout de 21 jours, il ne reste plus que très peu de 5 HMF. Nous avons nous-mêmes constaté que les colorations obtenues par la méthode de WINKLER pour les solutions de la gamme étalon diminuaient d'intensité avec le temps et même disparaissaient assez rapidement pour les solutions les plus diluées.

Dans le cas de jus clairs, la détermination colorimétrique faite directement sur le jus donne des résultats acceptables. Dans le cas de jus pulpeux ou troubles, on peut clarifier par centrifugation. Il est par contre indispensable de déféquer les jus rouges, car en milieu très acide les colorants anthocyaniques apparaissent rouge vif et troublent le dosage.

La méthode proposée par KOCH et KLEESAAT (1961) utilise le ferrocyanure de zinc dans les conditions ci-dessous :

— A 20 ml de jus coloré, on ajoute 50 ml d'eau distillée, 1 ml de solution de ferrocyanure de potassium ($K_4Fe(CN)_6, 3H_2O$) à 150 g par litre, puis 1 ml de solution d'acétate de zinc ($Zn(CH_3COO)_2$, $_2H_2O$) à 300 g par litre. On agite et complète à 100. On filtre. Le filtrat obtenu est incolore ou légèrement coloré en jaune dans le cas des jus blancs, plus ou moins coloré en rouge dans le cas des jus rouges. La défécation est donc très imparfaite. DUPAIGNE (1961) signale avoir obtenu de bonnes décolorations avec certains charbons actifs. L'essentiel est d'obtenir des filtrats parfaitement incolores.

Mais la défécation nécessite une dilution. Dans le cas de jus pauvre en 5 HMF, cette dilution est inacceptable.

Autre grave défaut : l'instabilité de la coloration en fonction du temps, surtout avec la p-toluidine. Le maximum est atteint rapidement après addition de l'acide barbiturique, la lecture se faisant exactement 3 minutes après cette addition dans la technique de WINKLER, puis la coloration disparaît rapidement. Mais DUPAIGNE (1961) signale que, en traçant les courbes de variations de la couleur en fonction du temps, il a constaté que le maximum n'est pas atteint dans le même laps de temps pour diverses concentrations : il l'est en 1 minute pour une concentration de 5 γ, 2,5 minutes pour 10 γ, 3 minutes pour 20 γ.

Cet auteur a cherché à stabiliser l'évolution de la couleur par un abaissement de la température. Les tubes à réaction sont placés dans la glace fondante. Un inconvénient, la formation de buée sur les parois de la cuve, est évité par emploi d'antibuée aux silicones pour glaces d'automobiles.

Le même auteur propose l'emploi de réactifs plus concentrés que ceux de WINKLER, ceci dans le but d'éviter la dilution de la couleur.

Enfin, et inconvénient capital, la réaction colorée obtenue avec la p-toluidine et l'acide barbiturique peut ne pas être due au seul hydroxyméthylfurfural. Nous avons en effet vérifié que la p-toluidine donne à froid, et en l'espace de 2 minutes environ, une coloration rouge intense avec le furfurol fraîchement distillé.

Par conséquent, et en l'état actuel de nos connaissances, la méthode colorimétrique de WINKLER non spécifique, peut être proposée, non comme méthode d'identification et de dosage de l'hydroxyméthylfurfural, mais plus justement comme l'indice de la présence dans les jus envisagés de dérivés furfuriques.

IV. — CONCLUSIONS

L'hydroxyméthylfurfural que l'on peut déceler dans les jus de fruits est susceptibles de se former au cours de la dégradation thermique des hexoses ; c'est également un produit intermédiaire de la réaction de MAILLARD.

Les méthodes proposées pour sa recherche et son dosage sont nombreuses. Aucune ne donne réellement satisfaction.

Parmi les plus couramment utilisées, la chromatographie sur papier est peu sensible, tandis que la méthode colorimétrique de WINKLER n'est pas spécifique.

Reçu pour publication en mars 1962.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AMERINE M. A., 1948. Hydroxymethylfurfural in California wines. *Food Res.*,, **13**, 264-269.

DULL, 1895. Chem. Ztg. **19**, 216. D'après GRIGNARD V., 1945. Traité de Chimie Organique, **18**, Masson et Cie Ed., Paris.

DUPAIGNE P., 1961. Choix d'une méthode de dosage du furfurol dans les jus et concentrés de fruits. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **54**, 21.

Espinosa N. A., 1959. Mesures et méthodes pour empêcher la fabrication de « vins » de sucre ou l'addition de telles boissons aux vins naturels. *Bull O. I. V.*, **32**, n° 344 50-65.

Fiehe J., 1908. Eine Reaktion zur Erkennung und Unterscheidung von Kunsthonigen und Naturhonigen. *Ztg. Unters. der Nahrungs. und Gen.*, **16**, 75-77.

Hadorn H., Kovacs A. S., 1960. Zür Untersuchung und Beurteilung von ausländischen Bienenhonig auf Grund des Hydroxymethylfurfural und Diastasegehaltes. *Trav. Chim. Alim. Hyg.*, **51**, 373-390.

Haworth W. N., Jones W. G. M., 1944. The conversion of sucrose into furan compounds : 5-hydroxymethylfurafuraldehyde and some derivatives. *J. Chem. Soc.*, **1**, 668.

Hodge J. E., 1953. Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, **1**, 928-943.

Kiermayer, 1895. Ueber ein furfurolderivat aus Lävulose. *Chem. Ztg.* n° 43, 1003-1005.

Koch J. von, Kleesaat R., 1959 : Zur Frage der Naturreinheit von Fruchtsäften. *Deutsche Lebensm.* n° 10, 246-251

Kruisheer, 1932. *Rec. Trav. Chim. P. B.*, **51**, 276. D'après Grignard V., 1945. Traité de Chimie Organique, **18**, Masson et Cie, Ed. Paris.

Maillard L. C., 1912. Action des aminoacides sur les sucres : Sur la formation des mélanoïdines par voie méthodique. *C. R. Acad. Sci.*, **154**, 66.

Melitz A., Drews H., 1959. Untersuchung über Vorkommen und Entstehung von Oxymethylfurfurol in Traubensaften, Apfelsäften und daraus hergestellten Konzentraten. *Flüssiges Obst.*, **26**, 5-14î.

Michel A., 1945. Contribution à l'étude chimique des jus de raisin et des jus de fruits commerciaux. *Bull. O. I. V.*, **18**, n° 167-170, 34-54 ; n° 171/174, 91-100.

Montgommerry, Wiggins, 1951. d'après Naffa P., et André Y., Transformation du saccharose en phase solide à chaud sous l'effet de la vapeur d'eau surchauffée ou de vapeurs chloryhdriques. *Sucrerie Française*, **99**, 165, 198, 229.

Patron A., 1953. Les phénomènes d'oxydation dans la production et la conservation des jus de fruits. *Ann. Inst. Fruits et Agrumes coloniaux*, n° 7, 55-57.

Petit L., 1959. Recherches sur la réaction de Maillard. *Ann Technol. agric.*, **8**, 1-33.

Schade J. E., Marsh G. L., Eckert J. E., 1958. Diastase activity and hydroxymethylfurfural in honey and their usefulness in detecting heat alteration. *Food Res.*, **23**, 446.

Seliwanoff T., 1887. Notiz über eine Fruchtzucker-Reaktion. *Ber. Deutsch. Chem. Gesell.*, **20**, 181-182:

Sulser H., Hogl O., 1951. Anwendung der Papierchromatographie auf lebensmittelschemische Problem. Untersuchung verschiedener Essigarten. *Mitt. Gebiet. Lebensm. Hyg.*, **4**, 403-408.

Turners J. H., Rebers P. A., Barrick P. L., Cotton R. H., 1954. Determination of 5-hydroxyméthylfurfurol and related compounds. *Annal. Chem.* **26**, 898.

Van Ekenstein, Blanskma, 1910. d'après Grignard V., 1945. Traité de Chimie Organique, **18**, Masson et Cie, Éd. Paris.

Volsken 1954. d'après Wahl P., 1960. Produits de la décomposition thermique des sucres et leur influence physiologique sur l'organisme humain. *V^e Symposium sur les substances étrangères dans les aliments*, Budapest, 11-16 mai 1952, 159-177 ; Maison d'édition de l'Académie Hongroise des Sciences.

Weger B., 1957. Der analytische Nachweiss von Konzentratenzusatz. *Fruchtsfät-industrie*, 128.

Winkler O., 1955. Beitrag zum Nachweiss und zur Bestimmung von Oxymethylfurfurol in Honing und Kunsthonig. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **102**, n° 3, 161.

Wolfrom M. L., Schuetz R. D., Cavalieri L. F., 1948. Chemical interactions of amino-compounds and sugars : the conversion of D-glucose to 5-hydroxymethyl 2-furaldehyde. *J. Amer. Chem. Soc.*, **70**, 514.

Le Directeur-Gérant : M. L. Cagnac

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 20-5-1962.

Dépôt légal : 2^e trimestre 1962. N° d'impression : 484.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (3), 175-218.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES RÉACTIONS ENZYMATIQUES DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES PEU HYDRATÉS : LA DÉGRADATION DE L'AMIDON PAR LES AMYLASES EN FONCTION DE L'ACTIVITÉ DE L'EAU ET DE LA TEMPÉRATURE (1)

PREMIÈRE PARTIE

R. DRAPRON et A. GUILBOT

Avec la collaboration technique de Françoise BARBE

Laboratoire de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales, C. E. R. D. I. A., Le Noyer Lambert, Massy (Seine-et-Oise)

SOMMAIRE

En technologie, au cours du stockage et de la transformation des produits agricoles et alimentaires, on assiste à des modifications du milieu qui peuvent être dues à différentes causes : l'action des microorganismes, les réactions chimiques et également, pour une part importante, les actions enzymatiques.

Ces modifications peuvent avoir un rôle néfaste, ou au contraire souhaitable pour l'amélioration des produits.

Or, jusqu'à présent, la majeure partie des travaux concernant l'action des enzymes a été effectuée *in vitro*, en présence d'un excès d'eau ; on peut se demander, dans ces conditions, dans quelle mesure les conclusions de ces travaux sont extrapolables aux actions qui se déroulent dans les milieux naturels relativement peu hydratés, surtout lorsqu'il s'agit d'enzymes tels que les hydrolases, faisant intervenir l'eau directement dans les réactions qu'elles provoquent.

Les travaux qui ont été entrepris dans le but de relier la teneur en eau et l'évolution des processus enzymatiques sont encore peu nombreux et laissent la place à certaines critiques.

Dans ce domaine nouveau, les relations existant entre l'état de l'eau, la structure du milieu et l'évolution de l'action enzymatique à différentes températures, n'ont pas fait l'objet de recherches approfondies.

C'est dans le but d'élucider, au moins partiellement, ces problèmes que nous avons entrepris de nouvelles recherches sur le comportement séparé des amylases alpha et bêta purifiées, dans des milieux aussi simples et aussi définis que possible, en fonction de l'humidité relative et pour les températures de 21 et 31°C.

Les résultats obtenus nous ont permis de montrer l'intérêt que présente, pour prévoir l'évolution enzymatique d'un milieu, la connaissance des isothermes de sorption et en particulier la

(1) Travail ayant fait l'objet d'une thèse soutenue par R. DRAPRON, pour obtenir le titre d'Ingénieur C. N. A. M.

notion d' « eau solvante ». L'amylolyse apparaît comme localisée aux points de contact de l'enzyme et du substrat en raison de la rigidité du milieu et aboutit ainsi à une limite. L'augmentation de la température et de l'hydratation, facteurs susceptibles de fournir plus de mobilité au milieu, accroissent la vitesse de l'amylolyse et sa valeur limite.

De nouvelles expériences sont encore nécessaires pour étayer ces hypothèses, les généraliser à d'autres enzymes, et voir dans quelle mesure elles s'étendent aux milieux naturels.

PLAN DU MÉMOIRE

INTRODUCTION.

TRAVAUX ANTÉRIEURS.

I. L'eau dans les milieux biologiques : son état, son rôle comme facteur d'organisation.
- A. — Les liaisons de cohésion intermoléculaires.
- B. — Hydratation des molécules organiques.

II. Intervention de l'eau dans la réactivité enzymatique des milieux biologiques.
- A. — Manifestations globales observées dans les milieux naturels.
- B. — Manifestations d'actions enzymatiques observées dans les mélanges artificiels.

TRAVAUX PERSONNELS : Dégradation de l'amidon par les amylases en fonction de l'activité de l'eau et de la température.

I. Conditions expérimentales.

II. Résultats obtenus et discussion.
- A. — Affinité pour l'eau des milieux enzymes — substrat et de leurs constituants.
- B. — Comportement de la β-amylase en fonction de l'activité de l'eau.
- C. — Comportement de l'α-amylase en fonction de l'activité de l'eau.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

INTRODUCTION

L'activité physiologique des cellules, et d'une façon plus générale, les modifications enzymatiques, chimiques et physiques qui se produisent dans les milieux biologiques sont fonction du degré d'hydratation de ces milieux.

Lorsque leur teneur en eau est suffisamment faible, les graines et certains microorganismes sont dans un état de vie ralentie. Dès que les conditions extérieures permettent une réhydratation convenable des constituants cellulaires, la graine germe, les microorganismes se développent rapidement.

Ainsi que certains chercheurs l'ont signalé depuis longtemps (MAYER et PLANTEFOL, 1925 *a*) ; (KURSSANOV, 1941) ; (FLEURY et COURTOIS, 1948), la cinétique et la réversibilité des réactions peuvent être affectées par la teneur en eau totale du milieu et la quantité d'eau « liée » à ses différents constituants.

Or, la majeure partie des travaux concernant l'étude des réactions enzymatiques a été effectuée *in vitro* en présence d'un excès d'eau ; on peut se demander dans ces conditions, dans quelle mesure les conclusions de ces travaux sont extrapolables aux actions qui se déroulent dans les milieux relativement peu hydratés, et surtout lorsqu'il s'agit de réactions faisant intervenir l'eau, comme c'est le cas avec les hydrolases.

Ces milieux peu riches en eau sont caractérisés par une rigidité de structure en raison de l'existence de liaisons de cohésion intra et intermoléculaires. Ces dernières liaisons peuvent du reste être réalisées par l'intermédiaire de molécules d'eau.

Suivant la teneur en eau d'un système biologique et l'affinité des constituants de ce système pour l'eau, celle-ci peut se présenter à l'état de molécules rigidement liées, participant à la structure de leur substratum, aussi bien qu'à l'état de molécules possédant un « degré de liberté » pouvant atteindre, à la limite, celui de l'eau pure sous forme liquide à la même température. Dans un milieu déterminé, ce n'est qu'à partir d'une certaine activité thermodynamique (humidité relative), que l'eau peut intervenir pour assurer le déroulement normal des réactions biochimiques. On conçoit donc tout l'intérêt que présente la connaissance précise de l'influence de ce facteur sur la nature et la cinétique des actions enzymatiques.

Pourtant, en enzymologie, peu de travaux ont été entrepris dans ce sens ; de plus, les observations qui ont été faites portent sur les actions de systèmes enzymatiques complexes, auxquelles ont pu se superposer, suivant les conditions, l'action de microorganismes et les modifications purement chimiques (réactions de MAILLARD, autooxydations) sans que l'on puisse fixer la part exacte qui revient à chacun de ces phénomènes. C'est pourquoi, même si la transposition directe aux milieux naturels des résultats obtenus en milieu synthétique soulève de fortes objections (KURSSANOV, 1941), (OPARIN, 1937), de telles investigations représentent cependant une étape indispensable pour l'étude de ce problème.

Aussi, estimons-nous intéressant d'entreprendre l'étude du comportement d'enzymes telles que les hydrolases dans des milieux synthétiques peu hydratés. Cette étude, du point de vue théorique, peut fournir des renseignements nouveaux sur le mécanisme et les conditions de réversibilité éventuelle des réactions enzymatiques. Du point de vue pratique, elle doit permettre :

— d'aider à mieux fixer les conditions de stockage des produits alimentaires sans altération de leurs qualités ;

— d'orienter et de régler les transformations enzymatiques naturelles ou provoquées, dans le but d'améliorer les propriétés de certains produits (germination, fermentations, ensilages).

Dans ce domaine nouveau, nos recherches ont porté tout d'abord sur la mise au point de conditions opératoires permettant de suivre en fonction de l'activité de l'eau du milieu, l'évolution qualitative et quantitative des produits de dégradation de l'amidon sous l'action de la bêta-amylase et de l'alpha-amylase.

Plusieurs raisons nous ont amené à choisir ces enzymes :

— d'une part, de nombreux travaux ont permis de préciser certains aspects de leur structure ; leurs conditions d'action *in vitro* en milieu aqueux, ainsi que le type de transformations réalisé par chacune d'elles ont été en partie établis ;

— d'autre part, leur activité dans les graines en cours de stockage ou de germination ne semble pas toujours avoir été mise en relation avec l'activité de l'eau ;

— enfin, l'examen critique des travaux effectués dans ce sens avec certains complexes glucidasiques, montre que l'interprétation des phénomènes observés reste discutable, compte tenu des conditions expérimentales utilisées par les auteurs.

Les recherches que nous avons entreprises sur des milieux synthétiques ont surtout eu pour but :

— de déterminer le seuil d'activité de l'eau pour lequel la réaction amylolytique est décelable ;

— de suivre, en fonction du temps, le comportement respectif de ces deux systèmes enzymatiques sous différentes conditions d'humidité et à des températures voisines de celles où ils peuvent exercer leur action à l'état naturel, soit 21 et 31°C.

Les résultats obtenus doivent aider à mieux connaître le comportement de ces amylases au cours du stockage des farines de céréales et de certains stades des transformations technologiques.

TRAVAUX ANTÉRIEURS

I. — L'EAU DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES : SON ÉTAT, SON RÔLE COMME FACTEUR D'ORGANISATION

La plupart des milieux biologiques naturels offrent, en fonction de la quantité d'eau qu'ils renferment, une texture présentant à des degrés divers une certaine rigidité, en même temps que plusieurs propriétés de l'état liquide, comme c'est le cas pour les gels par exemple.

La rigidité, qui implique l'existence de forces d'attractions importantes entre les constituants d'un milieu, est une des caractéristiques principales de l'état solide. La définition de cet état se ramène donc à un problème de structure.

Etant donné que nous serons amenés à observer le développement de l'action enzymatique dans des milieux quasi solides, il nous a semblé nécessaire de rappeler brièvement certains points fondamentaux touchant la structure des composants de ces milieux, structure qui peut éventuellement influencer le comportement des enzymes. Les sources auxquelles nous avons puisé sont nombreuses ; nous citerons en particulier les ouvrages généraux de PAULING (1948, 1956), de CHAMPETIER (1948), de GORTNER (1949), de BENEZECH (1958) et de EDSALL (1958).

Déjà, en milieu liquide, le comportement physico-chimique des enzymes est déterminé par les forces intermoléculaires qui les associent au substrat, aux molécules du solvant et aux autres solutés présents dans le milieu (ions, en particulier). Ces interactions jouent un rôle décisif dans le mécanisme et la cinétique des réactions catalysées par les enzymes (KIRKWOOD, 1954) ; l'expérience montre que, dans certains cas, les liaisons réalisées peuvent se manifester avec une très grande spécificité : c'est le cas de la liaison enzyme-substrat.

Dans ces conditions, l'eau intervient à la fois :

— comme élément participant à l'organisation des constituants du système ;

— comme solvant permettant le déplacement des molécules et facilitant ainsi les réactions enzymatiques dans lesquelles elle peut être même impliquée directement.

Au fur et à mesure que la concentration en eau diminue, celle-ci va jouer un rôle prépondérant comme agent d'organisation et devenir le facteur limitant de la réaction enzymatique.

En se rapprochant de l'état solide, certaines forces d'interactions deviennent de plus en plus importantes, diminuant la fréquence des chocs moléculaires et limitant les déformations internes des molécules dues à l'agitation thermique ; ce qui entraîne la rigidité du milieu.

Avant de préciser l'évolution de l'état de l'eau dans les milieux biologiques et son rôle dans l'organisation de la structure de leurs constituants, nous allons indiquer les différents types de liaisons intermoléculaires susceptibles d'intervenir dans la cohésion de ces systèmes.

A. — Les liaisons de cohésion intermoléculaires

Suivant la classification de CHAMPETIER (1948), les *composés hétéropolaires* groupent toutes les combinaisons salines formées de deux ou plusieurs ions ; en solution aqueuse, ces composés sont, suivant leur concentration, peu ou totalement dissociés en leurs ions constitutifs qui d'ailleurs, préexistent dans le cristal. La stabilité de l'édifice cristallin est conditionnée par les actions électrostatiques qui se développent entre eux : actions répulsives ou attractives suivant la charge de ces ions.

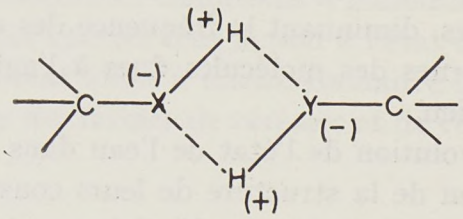
Les *composés homéopolaires* comprennent les substances moléculaires ou macromoléculaires dans lesquelles les atomes sont réunis par des liaisons covalentes ; ces corps conservent leur individualité et la majeure partie de leur intégrité en solution. Cependant, comme l'a fait remarquer CHAMPETIER, cette distinction très tranchée correspond à des cas extrêmes, et il existe de nombreux composés biologiques dont le caractère n'est ni purement hétéropolaire ni purement homéopolaire, mais participe de l'un et de l'autre, c'est le cas par exemple des substances d'origine protéique qui se comportent en solution comme des polyélectrolytes.

Les enzymes et leurs substrats macromoléculaires peuvent se classer en première approximation parmi les constituants biologiques homéopolaires. Dans ce groupe, on distingue généralement les molécules polaires et les molécules non polaires, suivant que les centres de gravité de leurs charges positive et négative coïncident ou ne coïncident pas ; ce qui, en principe, peut être déterminé par la mesure des moment électriques permanents des molécules. Ces corps possèdent un état d'organisation qui est assuré par des forces s'exerçant entre molécules voisines de nature identique ou différente, soit par l'intermédiaire de certains groupements atomiques, soit par l'intermédiaire de molécules d'eau.

Dans le cas de composés non polaires, les forces intermoléculaires sont du type VAN DER WALLS. Ces forces très généralement répandues s'exercent à courte distance ; elles ont leur origine dans l'attraction électrostatique des noyaux d'une molécule vis-à-vis des électrons d'une autre, attraction qui est incomplètement

compensée par la répulsion des électrons entre eux. En général cette attraction s'accroît avec l'augmentation du nombre d'électrons par molécule, c'est-à-dire avec le poids moléculaire.

Dans le cas de substances possédant des groupements polaires, en plus des forces de VAN DER WALLS, interviennent au niveau de ces groupements, des forces de liaison polaire et du type liaison hydrogène. D'après PAULING (1948), cette dernière liaison serait réalisée par un atome d'hydrogène formant pont entre deux atomes électronégatifs :



elle est plus faible que les liaisons ordinaires ioniques ou covalentes, mais plus importante que les liaisons polaires et les forces d'attraction de VAN DER WALLS (tableau I), son rôle est prépondérant dans les milieux biologiques, ainsi que nous allons le préciser par la suite.

TABLEAU I

Énergies des différents types de liaisons (d'après CHAMPETIER) (1948).

Type de liaison	Énergie de liaison
Liaison covalente ou homéopolaire	25 000 à 220 000 cal. g.
Liaison hydrogène	5 000 à 10 000 cal. g.
Liaison polaire	< 5 000 cal. g.
Liaison de VAN DER WALLS	< 1 000 cal. g.

B. — Hydratation des molécules organiques

1° *Structure et propriétés de la molécule d'eau.*

En raison de la dissymétrie de ses charges positive et négative, la molécule d'eau se comporte comme un dipôle. L'existence d'un moment électrique dipolaire élevé provoque l'association des molécules d'eau entre elles et leur organisation dans le cristal de la glace (fig. 1). Elle explique également leur tendance à s'unir soit avec les ions pour former des ions hydratés, soit avec d'autres molécules polaires.

Au contact de groupements polaires, le dipôle H_2O serait fixé par des forces électriques de même nature que celles associant les molécules d'eau entre elles, mais plus fortes.

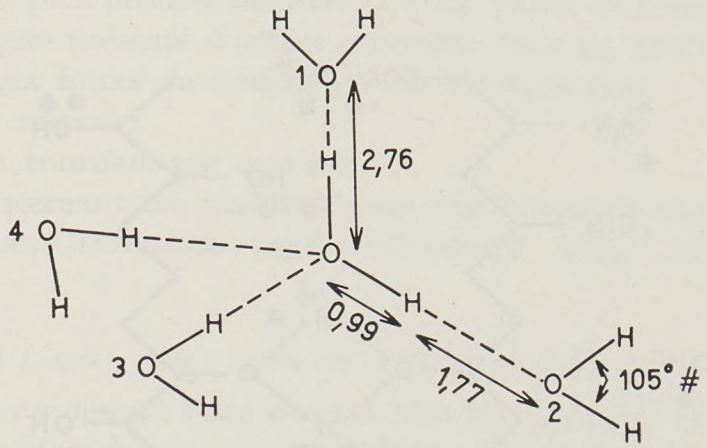


FIG. 1. — *Coordination tétraédrique des molécules d'eau dans le cristal de glace* (d'après EDSALL, 1958).

Les molécules 1 et 2, de même que la molécule centrale sont situées dans le plan du papier. Les molécules 3 et 4 se situent respectivement au-dessus et en dessous de ce plan, ainsi les atomes d'oxygène 1, 2, 3 et 4 sont aux sommets d'un tétraèdre régulier.

Les distances interatomiques sont indiquées en Angstrœms.

2° *Affinité pour l'eau des constituants des milieux biologiques.*

De nombreuses molécules biologiques, acides aminés, protéines, oligoholosides, polyholosides notamment, en raison de leurs groupements polaires possèdent une affinité importante pour l'eau ; ce sont des molécules hydrophiles.

Les principaux groupements responsables de cette affinité pour les molécules d'eau sont les suivants : le groupe carboxyle $\left(-C\begin{matrix}OH\\ \\ O\end{matrix}\right)$, le groupe aminé $\left(-N\begin{matrix}H\\ \\ R\end{matrix}\right)$ (où R peut représenter un atome d'hydrogène), le groupe hydroxyle (— OH), le groupe aldéhyde $\left(-C\begin{matrix}H\\ \\ O\end{matrix}\right)$, le groupe carbonyle $\left(>C=O\right)$.

C'est donc en fonction de ces groupements que se feront, au cours des phénomènes d'hydratation, la localisation et l'orientation des molécules d'eau à la surface des macromolécules. Dans la figure 2, sont schématisés les différents groupements capables de fixer les molécules d'eau ainsi que les types de liaison de cohésion intermoléculaires susceptibles de se réaliser.

Dans les composés ainsi hydratés, les molécules d'eau sont retenues avec une énergie d'autant plus grande que la distance du dipôle H_2O au groupement polaire est plus faible (fig. 3). On conçoit donc qu'il puisse exister tous les intermédiaires entre l'eau la plus solidement fixée et l'eau dite « libre » ; autrement dit, il y aurait une variation d'activité thermodynamique de l'eau, allant de celle de l'eau pure à une activité si réduite, que la molécule d'eau retenue ferait partie quasi intégrante de la particule qui la retient.

Le fait que l'eau contenue dans certains matériaux ne possède pas les caractéristiques de l'eau libre, est illustré de façon particulièrement nette par l'exemple de la méduse qui, avec une teneur en eau supérieure à celle de la mer (99,8 p. 100 et 96,5 p. 100 respectivement), se présente sous forme d'une gelée solide (GORTNER, 1949). On retrouve, du reste, cette coexistence de deux phases aqueuses non miscibles dans le cas des coacervats.

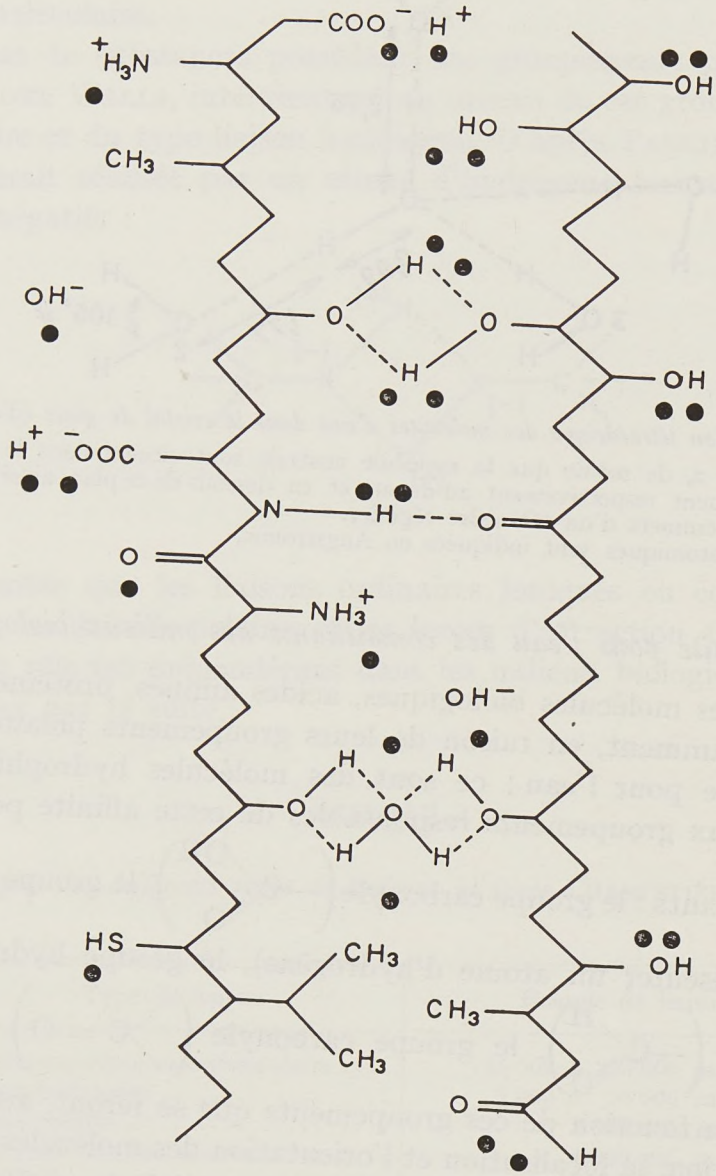


FIG. 2. — *Représentation schématique de différents types de liaisons entre chaînes macromoléculaires et de l'hydratation de leurs groupements polaires. (Seules ont été représentées les liaisons hydrogène intervenant dans la cohésion des chaînes.)*

● Molécule d'eau

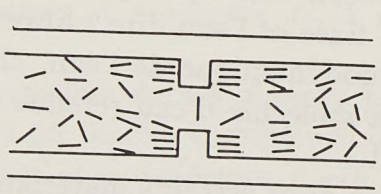


FIG. 3. — *Représentation schématique de l'orientation des dipôles de l'eau autour des groupes polaires d'une molécule*

Des observations plus précises montrent qu'une partie de l'eau contenue dans les systèmes biologiques présente d'autres anomalies dans ses propriétés :

— résistances aux forces de congélation ou d'évaporation ;

— pouvoir non solvant ;

— résistance au transfert par osmose.

Les travaux concernant ces problèmes ont fait l'objet de plusieurs mises au point bibliographiques (Duclaux, 1934) ; (Gortner, 1949) ; (Guilbot, 1952) ; (Benezech, 1958).

3° *L'eau « liée » dans les milieux biologiques.*

Habituellement, on désigne l'eau n'ayant plus les propriétés de l'eau ordinaire sous le terme d'eau « liée », terme qui ne préjuge en rien du mode et de l'énergie de liaison avec la substance.

Certains moyens d'investigation fournissent des renseignements plus précis sur l'état de l'eau dans les milieux biologiques. Parmi ceux-ci, la méthode de sorption consiste à mesurer la quantité d'eau fixée par un produit en fonction de la tension de vapeur d'eau et de la température du milieu.

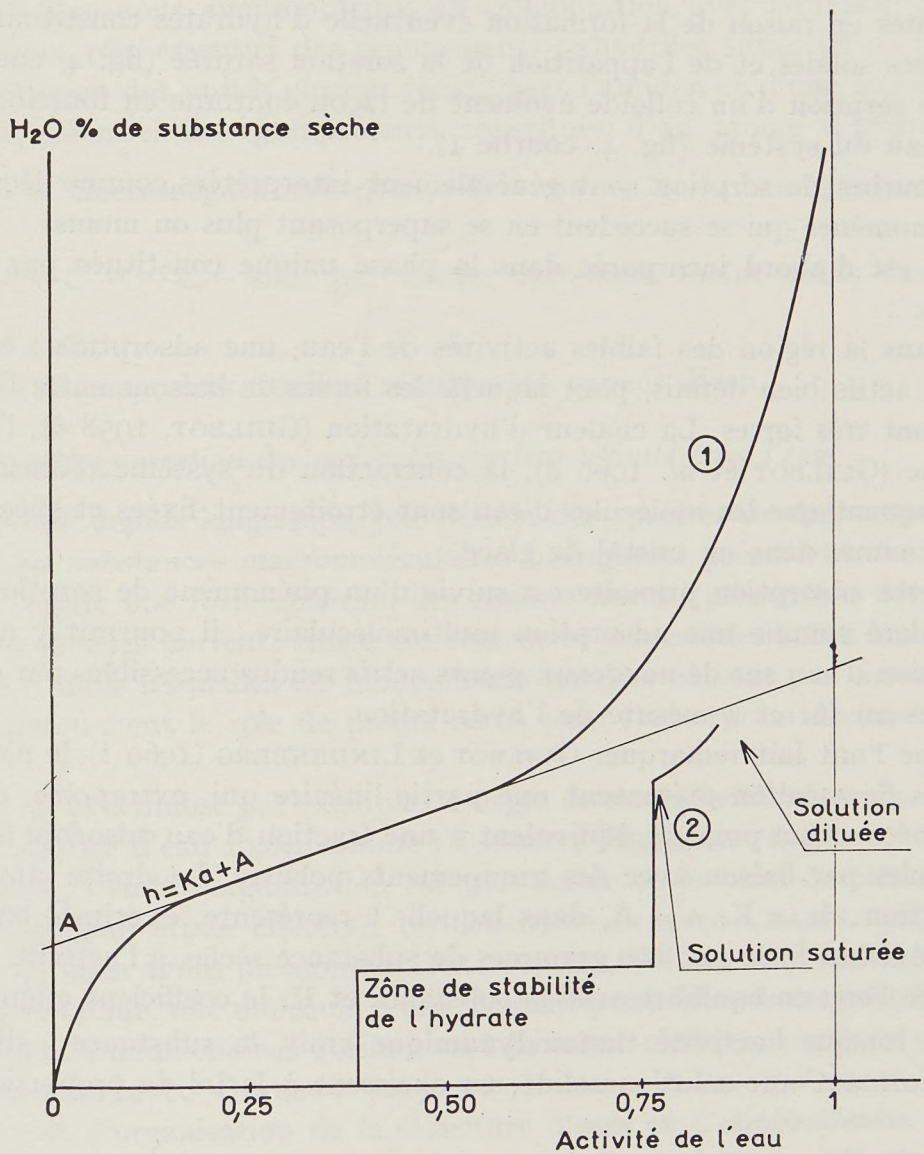


Fig. 4. — *Courbes de sorptions : (1) d'un colloïde, (2) d'un cristalloïde.*

KATZ (1917) et BRIGGS (1931, 1932) ont spécialement attiré l'attention des biologistes sur le fait que la tension relative de vapeur d'eau en équilibre avec le système eau-substrat, à une température donnée (tension de vapeur d'eau mesurée/ tension de vapeur d'eau saturante) représente d'une manière approchée l'activité de l'eau dans le système. L'eau libre a donc, par définition, un coefficient d'activité égal à 1 (100 p. 100 d'humidité relative). En portant sur un graphique la quantité d'eau fixée par un milieu biologique en fonction de l'activité de l'eau, on obtient une courbe en S rappelant celle décrite par BRUNAUER, EMMETT et TELLER (1938), BRUNAUER (1943), dans le cas de l'adsorption des gaz par les solides.

Suivant que les mesures seront effectuées en cours de déshydratation du milieu (désorption), ou en cours de réhydratation du produit sec (sorption), on obtiendra généralement deux courbes non nécessairement superposables, c'est ce que l'on appelle le phénomène d'hystérésis.

En faisant varier la température, on obtiendra un réseau d'isothermes de sorption, l'affinité pour l'eau des produits diminuant au fur et à mesure que la température s'élève.

Contrairement au diagramme d'hydratation d'un cristalloïde qui présente des discontinuités en raison de la formation éventuelle d'hydrates constituant de nouvelles phases solides et de l'apparition de la solution saturée (fig. 4, courbe 2), les courbes de sorption d'un colloïde évoluent de façon continue en fonction de l'activité de l'eau du système (fig. 4, courbe 1).

Ces courbes de sorption sont généralement interprétées comme décrivant plusieurs phénomènes qui se succèdent en se superposant plus ou moins.

L'eau est d'abord incorporée dans la phase unique constituée par le produit à l'état sec :

— Dans la région des faibles activités de l'eau, une adsorption s'effectue sur des points actifs bien définis, pour laquelle les forces de liaisons entre l'eau et son substrat sont très fortes. La chaleur d'hydratation (GUILBOT, 1958 *b*), l'absorption diélectrique (GUILBOT et *al.* 1960 *a*), la contraction du système (HERMANS, 1949, 1952), indiquent que les molécules d'eau sont étroitement fixées et spécifiquement orientées comme dans un cristal de glace.

— Cette adsorption primaire est suivie d'un phénomène de sorption qui peut être considéré comme une adsorption multimoléculaire ; il pourrait y avoir également fixation d'eau sur de nouveaux points actifs rendus accessibles par écartement des chaînes au fur et à mesure de l'hydratation.

Comme l'ont fait remarquer GUILBOT et LINDENBERG (1960 *b*), le plus souvent, les courbes de sorption présentent une partie linéaire qui, extrapolée, coupe l'axe des ordonnées en un point $\underline{A}$ équivalent à une fraction d'eau adsorbée à la surface des molécules par liaison avec des groupements polaires. La droite ainsi définie a pour équation : $h = K. a + A$, dans laquelle $\underline{h}$ représente, exprimée en grammes, la quantité d'eau fixée par 100 grammes de substance sèche, $\underline{a}$ l'activité thermodynamique de l'eau en équilibre avec la substance et $\underline{K}$, le coefficient angulaire.

Ainsi, lorsque l'activité thermodynamique croît, la substance « dissout » de l'eau, en formant une solution solide, en obéissant à la loi de proportionnalité de HENRY.

A partir d'une certaine activité, variable selon les produits, la courbe s'écarte de la droite, une nouvelle phase (aqueuse) apparaît et une quantité d'eau de plus

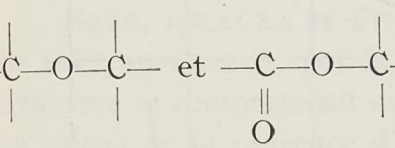
en plus importante se fixe par des forces plus faibles, soit de nature capillaire, soit de nature purement osmotique.

C'est dans cette troisième région que le gonflement, les phénomènes osmotiques, l'action du pH et des sels deviendraient de plus en plus prépondérants. En extrapolant la droite définie précédemment jusqu'à l'activité 1, GUILBOT et LINDENBERG ont montré, dans le cas de la levure de boulangerie, qu'il existe une concordance satisfaisante entre la quantité d'eau ainsi obtenue, représentant l'eau fortement fixée à 100 g. de substance sèche et la quantité d'eau non solvante vis-à-vis des premiers termes de la série des alcools aliphatiques (et de la molécule d'eau elle-même), déterminée par mesure de la répartition, à l'équilibre de diffusion, de différents alcools hydrophiles (LINDENBERG et ZUILI, 1952).

L'étude de la sorption de l'eau par les constituants des molécules biologiques a pu fournir d'autre part d'intéressantes précisions sur les groupements impliqués dans la fixation topochimique de l'eau et l'influence de la structure des molécules sur cette fixation, en particulier en ce qui concerne l'amidon et ses dérivés.

Principaux groupements hydrophiles impliqués.

Les résultats que nous avons obtenus en collaboration avec GUILBOT (1950-1957) ont montré le rôle essentiel des groupements oxhydriles situés en 2, 3 et 6 sur l'anneau pyranique des unités glucose constituant l'amidon et d'une façon plus générale, le rôle essentiel des groupements constitués d'un atome d'hydrogène relié à un atome électronégatif tel que —O— ou $\rangle$N— . Les groupements



sont par contre nettement moins actifs dans les régions de faibles et moyennes tensions relatives de vapeur d'eau.

Influence de l'état d'organisation des molécules sur leur affinité pour l'eau.

Il a été montré depuis longtemps, par l'étude des spectres de diffraction des rayons X, que des substances macromoléculaires biologiques présentent des zones cristallines où il existe une forte cohésion des chaînes due à l'interaction des groupements polaires qu'elles portent. Entre ces régions se situent des zones amorphes de cohésion lâche, dans lesquelles les groupements polaires ne sont pas associés et peuvent jouer directement le rôle de points actifs pour l'adsorption des molécules d'eau.

Dans le cas de la cellulose par exemple, le degré de cristallinité intervient directement sur la quantité d'eau fixée, comme l'a montré HERMANS (1952).

Pour l'amidon, l'état d'organisation est plus faible et le taux de cristallinité moins élevé. Dans une étude effectuée en collaboration avec CHARBONNIÈRE et GUILBOT (1961 *b*), nous avons pu montrer l'intervention de l'eau sur l'établissement de la structure cristalline, une molécule d'eau formant pont entre deux groupements — OH appartenant à deux chaînes voisines ou à la même chaîne enroulée en spirale.

En collaboration avec GUILBOT (1950-1957), nous avons également étudié l'influence de l'état d'organisation de la structure d'oses et d'oligoholosides sur la sorption de l'eau par ces produits.

A l'état cristallisé, on observe la formation éventuelle d'hydrates, stables dans une zone de pressions relatives de la vapeur d'eau plus ou moins étendue, puis la formation de la solution saturée pour une activité de l'eau bien déterminée, et au-delà, la dilution progressive de cette solution.

A l'état amorphe, nous avons examiné l'affinité pour l'eau de certains polymères du glucose (maltose et maltotriose).

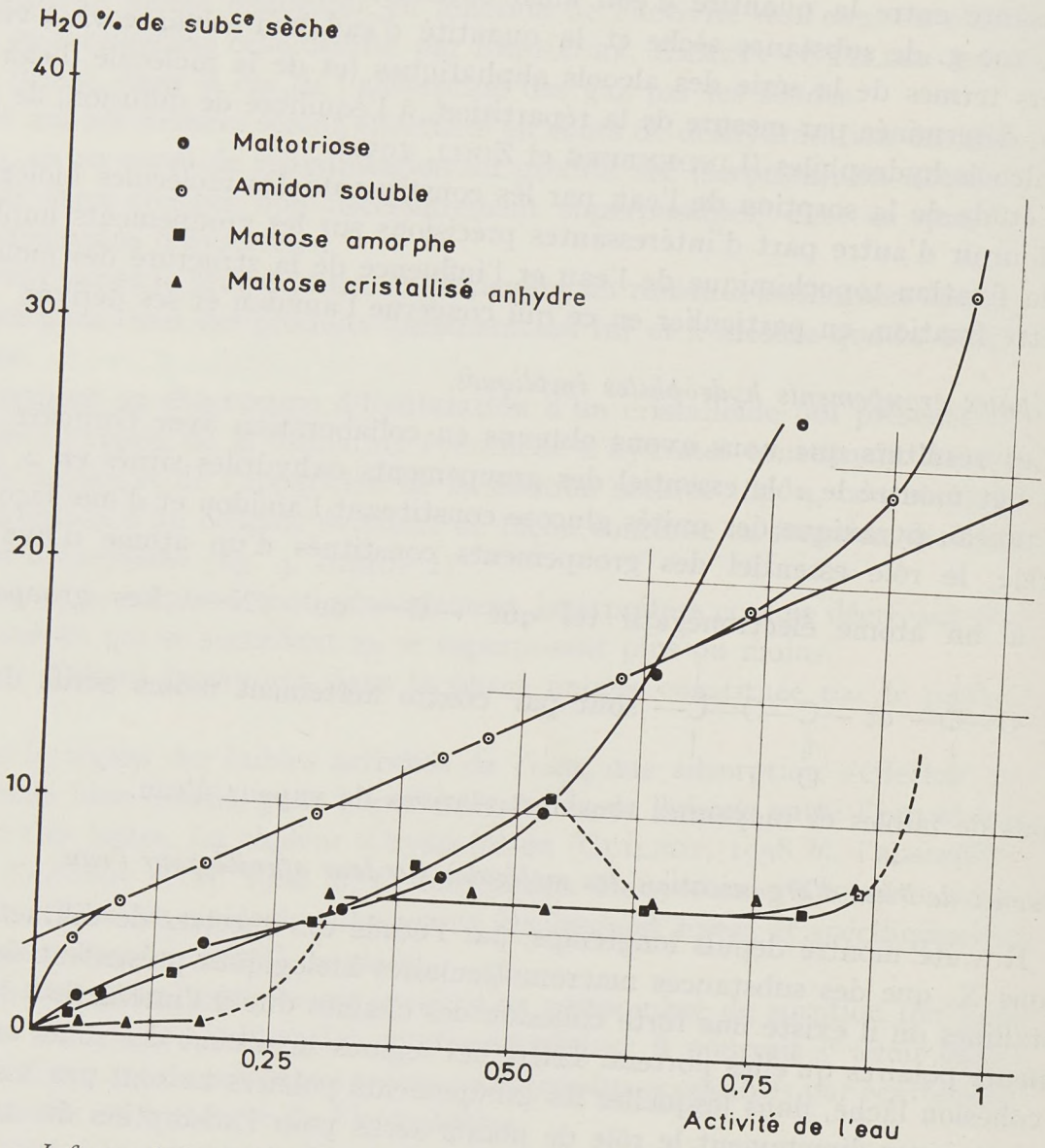


FIG. 5. — *Influence de l'état d'organisation de certains oses et oligoholosides sur leur affinité pour l'eau*

La figure 5 montre que les isothermes de sorption de ces substances, obtenus à 23°C, sont pratiquement confondus jusqu'au moment où l'activité de l'eau est suffisamment élevée pour permettre le passage de l'état amorphe à l'état cristallin (vérifié aux rayons X) avec ou sans formation d'hydrate, selon le produit.

Énergies des liaisons eau-substrat.

Comme nous l'avons précédemment indiqué, les liaisons impliquées sont surtout du type liaison hydrogène. Les techniques de spectrographie infra-rouge et de spec-

trologie hertzienne sont susceptibles de fournir un ordre de grandeur de ces énergies de liaison. Dans le cas du sytème amidon-eau, il est ainsi possible de différencier, d'après l'ordre de grandeur des énergies mises en jeu, les divers états de l'eau prédominant dans le processus de sorption, comme l'ont établi GUILBOT et *al.* (1960 *a*).

Nous venons de montrer, plus spécialement dans le cas de l'amidon et de ses dérivés, comment l'activité de l'eau conditionne leur état d'organisation. Ces phénomènes sont trés généraux et dans le cas de certaines protéines, les études ont été également très poussées. Cependant, la diversité des groupements polaires des molécules protéiques rend souvent plus complexe l'analyse de leurs courbes de sorption.

Un petit nombre de travaux seulement ont eu pour but de connaître de quelle manière l'état de l'eau fixée sur les protéines enzymatiques intervenait sur leur activité. En ce qui concerne leur affinité pour l'eau certaines mesures de sorption ont cependant été effectuées comme dans le cas du lysozyme (HNOJEWYJ et REYERSON, 1959).

Par ailleurs, OVCHINUIKOW (1951), rejoignant l'idée fondamentale d'eau non solvante, déduit de ses travaux sur la catalase que certaines substances sont moins solubles dans l'eau « liée » à la protéine enzymatique que dans l'eau libre.

Des recherches plus récentes, concernant la capacité d'hydratation de la catalase pure en solution, ont été entreprises par MALMON (1957) au moyen de la méthode de diffusion des rayons X. Cet auteur a montré que la molécule est capable de fixer une importante quantité d'eau en subissant un fort gonflement.

Enfin, ISEMURA et FUJITA (1957) étudiant l'état d'hydratation de la molécule de taka amylase A, par la mesure des volumes spécifiques partiels, concluent que l'enzyme se comporterait comme une molécule compacte et rigide, retenant peu d'eau, en raison de la présence d'un groupement prosthétique de nature glucidique situé dans les interstices des hélices polypeptidiques de la protéine.

En résumé, bien que nos connaissances sur l'état de l'eau dans les milieux biologiques et son rôle comme facteur d'organisation soient encore fragmentaires, il apparaît clairement que cet élément fondamental peut intervenir :

— d'une part, dans l'organisation des structures, soit en facilitant le déplacement et l'orientation des molécules, soit plus directement en formant des ponts interchaînes par l'intermédiaire de liaisons hydrogène et en participant au motif structural (maltose, amidon, par exemple).

— d'autre part, aux humidités relatives élevées, dans les phénomènes de gonflement ou même de dispersion (formation de gels ou de solutions), en affaiblissant et en amenant la rupture des liaisons interchaînes ou intermoléculaires.

— enfin, nous avons vu comment on peut envisager, par l'étude du processus de sorption de la vapeur d'eau, de préciser, du moins en partie, le mécanisme de fixation de celle-ci et de faire la part de l'eau solvante ou non solvante existant dans le milieu. Il n'est pas douteux que cette technique se présente comme un outil de premier ordre pour les recherches sur l'intervention de l'eau dans la réactivité des constituants biologiques.

TABLEAU 2

Intervention de l'eau dans la réactivité enzymatique des milieux biologiques.

Matériel biologique examiné	Activité biologique mesurée	Température	Teneur en eau	Humidité relative	Seuil de l'activité enzymatique	Auteurs
Évolution d'actions enzymatiques dans les organes végétaux						
Bactéries				+	≠ 95 p. 100 H. R.	Semeniuk, 1954 ; Scott, 1957.
Levures				+	≠ 90 p. 100 H. R.	— —
Moisissures				+	70-80 p. 100 H. R.	— —
Mousses	Respiration		+	+	≠ 40 p. 100 H_2O	Mayer et Plantefol, 1925-1926.
	Assimilation chlorophyllienne		+	+	> 40 p. 100 H_2O	— —
Graines	Respiration		+	+		Jacquot et Mayer, 1925-1926.
	Germination		+			Whymper et Bradley, 1934.
	Activité globale de divers complexes glucidasiques	5 et 30°C	+		13 p. 100 H_2O à 30°C	Prokhorova et Kretovich, 1958 ; Glass, 1958.
		20°C	+		> 12 p. 100 H_2O	Shvetsova et Sosedov, 1958.
		30°C	+		16-18 p. 100 H_2O	Glass, 1958.
	Amylases		+		27 p. 100 H_2O	Swanson, 1935.
	Lipases	30°C			16-18 p. 100 H_2O	Glass, 1958 ; Taufel, 1944.
	Phytases	23°C		+	⩾ 90 p. 100 H. R.	Poisson et Guilbot, 1960.
		30°C	+	+	16-18 p. 100 H_2O	Glass, 1958.
Embryons de blé	Activité globale de divers complexes glucidasiques	20°C	+	+	> 20 p. 100 H. R.	Prokohorova et Kretovich, 1958.
	Lipases		+			— —
	Décarboxylase de l'acide glutamique					
	Transaminase de l'acide glutamique-alanine		+		9 à 12 p. 100 H_2O	Linko et Milner, 1960.
	Déshydrogénases		+		20-25 p. 100 H_2O	— — —
Évolution d'actions enzymatiques dans les produits alimentaires						
Poudre d'œufs	Lipases		+			Brooks, 1943.
	Lécithinases		+			— —
Fromages	Protéases		+			Raadsweld, 1952.
Farine de seigle	Amylases, protéases	30°C	+	+	75 p. 100 H. R.	Kiermeier et Coduro, 1955.
Pain	Amylases, protéases	30°C	+	+	36 p. 100 H. R.	Kiermeier et Coduro, 1955.
Pâtes alimentaires	Phospholipases B et D	25-30°C	+	+	45 p. 100 H. R.	Acker et Lück, 1958 ; Acker et Kaiser, 1959.
Évolution d'actions enzymatiques dans des mélanges synthétiques						
Peptones	Trypsine, protéases du pois	20°C	+	+	H. R. non précisée	Volgunov, 1948 ; Volgunov et Pokhno, 1949.
Amidon	Complexes amylasiques	35°C	+	+	< 75 p. 100 H. R. en présence de sels	Mashkovcev, Volgunov et Pokhno, 1951.
		37°C	+	+	75 p. 100 H. R. ; 46 p. 100 H. R. en présence de capillaires	Kiermeier et Coduro, 1954.
Lécithines	Phospholipases B et D	30°C	+	+	45 p. 100 H. R.	Acker et Lück, 1958 ; Acker et Kaiser, 1959.
	Enzyme X	30°C	+	+	85 p. 100 H. R.	Acker et Kaiser, 1959.

II. — INTERVENTION DE L'EAU DANS LA RÉACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES MILIEUX BIOLOGIQUES

A la suite des travaux que nous venons d'exposer, on conçoit que selon les interactions de l'eau avec les constituants du milieu, ces derniers puissent être dans un état plus ou moins réactif (maltose amorphe ou cristallisé, amidon dispersé ou rétrogradé, par exemple).

De fait, il a été possible de montrer que des réactions chimiques comme la réaction entre sucres et amino-acides (réaction de MAILLARD), demandent un minimum de teneur en eau pour se produire et présentent un optimum en fonction de l'humidité relative (LEA et HANNAN, 1949).

Dans le domaine des actions enzymatiques, on s'est encore peu attaché à relier directement l'activité de l'eau et l'évolution des processus mis en jeu au cours de transformations biologiques naturelles ou provoquées ; c'est ainsi, par exemple, que dans leur traité sur la physiologie des graines, CROCKER et BARTON (1957) ne se préoccupent guère de cet aspect fondamental des phénomènes. Lorsque des recherches sont entreprises dans ce sens, on considère, le plus souvent, l'activité de systèmes enzymatiques complexes, et c'est la teneur globale en eau, plus que le degré de liberté de celle-ci qui est prise en considération, si bien qu'il est difficile d'en tirer des lois générales.

Dans l'exposé qui va suivre, nous allons examiner les principaux travaux concernant l'évolution, en fonction de l'humidité, de certains sytèmes enzymatiques :

— chez les plantes — plus spécialement les graines — à divers stades physiologiques ;

— dans certains produits alimentaires au cours de transformations technologiques ou au cours de leur stockage ;

— dans des mélanges artificiels permettant d'étudier un type d'action enzymatique déterminé.

Les grandes lignes de cet ensemble sont rassemblées dans le tableau 2.

A. — Manifestations globales observées dans les milieux naturels

1° *Évolution d'actions enzymatiques complexes au cours de processus physiologiques.*

Dans le cas des microorganismes, de nombreux travaux ont montré la nécessité d'un minimum de pression relative de vapeur d'eau pour qu'ils puissent manifester leur activité. Des mises au point ont été faites sur ce sujet par SEMENIUK (1954) et SCOTT (1957). Pour la multiplication des bactéries, ce minimum est de l'ordre de 95-97 p. 100 (0,95-0,97 d'activité), il est voisin de 90 p. 100 (0,90) pour les levures, alors que pour la prolifération de certains types de moisissures il n'est que de 70 à 80 p. 100 (0,70 à 0,80), et même parfois inférieur.

Dans le cas des plantes et des graines, voici les principaux renseignements que l'on possède sur la manifestation de leurs activités vitales en fonction de leur hydratation :

a) *Phénomènes de respiration et de photosynthèse.*

Dès 1925-1926, MAYER et PLANTEFOL ont pu mettre en évidence l'influence de l'eau dans la manifestation des échanges de gaz carbonique et d'oxygène chez les mousses :

— les oxydations commencent à partir d'un seuil de teneur en eau correspondant à une chaleur d'hydratation nulle, leur intensité s'accroît ensuite en fonction de l'hydratation, puis demeure constante au-delà de 60 p. 100 ;

— le quotient respiratoire, supérieur à 1 pour les faibles humidités, devient voisin de l'unité au-dessus de 40 p. 100 ; ce qui indique la possibilité de deux types de dégradation (fermentation cellulaire et respiration) ;

— l'assimilation chlorophyllienne nécessite, pour se manifester, un seuil de teneur en eau plus élevé que celui observé pour la respiration.

Enfin les auteurs, rapportant les échanges à l'eau, considérée comme constituant cellulaire, ont défini un *rendement hydrobiotique* présentant un optimum en fonction de l'hydratation.

Dans le cas de la respiration, JACQUOT et MAYER (1925)-(1926) ont pu étendre aux graines les résultats obtenus avec les mousses. SHIRK (1942) a montré que dans les graines en cours de maturation, l'intensité respiratoire décroît en même temps que la quantité d'eau libre (eau congelable).

D'autres auteurs ont étudié l'évolution de l'intensité et du quotient respiratoires des graines après récolte en fonction de la teneur en eau, mais ils n'ont pas toujours fait la différence entre la respiration de la graine proprement dite et celle de la microflore existant à sa surface. MILNER (1947), utilisant des produits antifongiques, a été le premier à montrer la part prépondérante prise par les microorganismes dans le phénomène global mesuré.

b) *Germination.*

L'augmentation, dans la graine, de la quantité d' « eau faiblement fixée », permet, à partir d'un certain niveau, la manifestation des phénomènes caractéristiques de la germination, mais on ne possède sur ce sujet que peu de données précises.

Dans ses travaux sur la germination de graines de laitue, EVENARI (1957) indique que la phase d'activation qui suit l'imbibition est caractérisée par l'établissement de plusieurs processus enzymatiques, mais l'auteur n'a relié aucun de ceux-ci avec la teneur en eau de ces graines.

Dans le stade de germination proprement dite, il semble bien qu'il existe un optimum de teneur en eau conditionnant la vitesse des réactions enzymatiques (WYMPER et BRADLEY, 1934). Cet optimum n'est d'ailleurs pas parfaitement connu ; sa connaissance faciliterait certaines opérations telles que le maltage (DICKSON et GEDDES, 1949).

2° *Évolution de l'action de systèmes enzymatiques complexes, au cours du stockage et des transformations de produits agricoles et alimentaires.*

a) *Stockage des grains.*

La température et la teneur en eau sont des facteurs primordiaux pour la conservation de la viabilité ou de la valeur technologique des grains au cours de leur phase

de vie latente (Robertson et Gardner, 1939) ; (Touzard, 1958) ; (Poisson et Guilbot, 1959-1960).

Dans les processus qui s'établissent, les modifications attribuables aux enzymes propres aux grains n'ont fait l'objet que d'études assez restreintes, sans doute en raison de la difficulté de faire la part de ce qui revient aux microorganismes *en aérobiose.*

Swanson (1935) a été un des premiers à mettre en évidence la relation entre l'humidité et l'activité amylasique du blé.

Prokhorova et Kretovich (1958) étudiant l'évolution de certains oses et oligoholosides des grains de seigle et d'embryons de blé conservés à diverses humidités relatives, font les constatations suivantes :

— Il se produit un accroissement de la teneur en oses et une diminution de la teneur en saccharose dans les grains à 13 p. 100 d'eau à 30°C. C'est l'inverse que l'on observe pour une température de 5°C.

— Dans les embryons de blé, à 20°C, l'hydrolyse du saccharose est favorisée aux humidités relatives élevées, alors qu'en diminuant la teneur en eau le processus de synthèse prédomine. Le même phénomène se produit avec les glycérides.

Il a été montré récemment que plusieurs enzymes de l'embryon de blé (décarboxylase de l'acide glutamique, transaminase de l'acide glutamique-alanine), peuvent entrer en action à des teneurs en eau situées entre 9 et 12 p. 100, alors que les systèmes déshydrogénasiques ne manifestent leur action qu'à partir d'une humidité voisine de 20-25 p. 100 (Linko, 1960).

Lors du stockage *en anaérobiose,* le développement des micro-organismes étant généralement éliminé ou très restreint, il est plus facile de saisir les manifestations des enzymes du grain.

Shvetsova et Sosedov (1958) n'observent aucun changement significatif des caractéristiques biochimiques du grain de blé conservé en atmosphère confinée à 20°C et à 12 p. 100 d'eau. Pour des humidités plus élevées, ils constatent des phénomènes d'hydrolyse allant de pair avec l'amoindrissement des caractères technologiques et de la faculté germinative des grains.

De même, Glass (1958) a pu mettre en évidence, dans le blé, l'activité des glucidases, de la lipase et de la phytase à 16-18 p. 100 d'eau à 30°C ; pour la phytase, Poisson et Guilbot (1959-1960) ont récemment suivi son action dans le blé en fonction de l'humidité relative et de la température.

b) *Conservation et transformations technologiques des produits alimentaires.*

La majeure partie de ces produits contient des systèmes enzymatiques actifs, si bien qu'en plus des modifications d'ordre chimique et microbiologique, on observe souvent au cours de leur stockage :

— d'une part, des manifestations du métabolisme cellulaire telles que la respiration ou les fermentations intracellulaires ;

— d'autre part, des processus enzymatiques de l'état postmortem, intervenant après dislocation des cellules : hydrolyses, fermentations, brunissement faisant intervenir des sytèmes oxydasiques, activité des enzymes qui intervenaient dans la respiration.

Kiermeier (1954 *b*), Rothe (1957) et Acker (1958 *a*) ont déjà attiré l'attention sur l'importance d'une meilleure connaissance des conditions favorisant ces phénomènes.

Alors que des produits se conservent plusieurs années sans diminution de leur qualité, d'autres ne montrent qu'une faculté de conservation très limitée. C'est ainsi que l'évolution des caractères organoleptiques de certaines denrées alimentaires ont été attribuées à l'action d'enzymes :

— acide ascorbique oxydase en particulier dans le cas de légumes secs (DIEMAIR, 1948) ;

— adénosine triphosphatase dans le cas des viandes cryodéshydratées (HUNT et MATHESON, 1959) ;

— lipases et phosphatases provoquant l'acidification des flocons d'avoine (McCANCE et WIDOWSON, 1956) ;

— enzymes intervenant dans le rancissement des produits céréaliers (KIERMEIER et TAUFEL, 1938) ; (POPOV et NELJUBINA, 1958).

Les transformations enzymatiques peuvent être parfois orientées dans le but d'améliorer les propriétés de ces produits, soit par l'intermédiaire des systèmes enzymatiques de certains microorganismes (fermentation, ensilages), soit par addition directe de préparations enzymatiques (HEISS, 1950).

On a surtout étudié l'action de la température sur ces phénomènes et l'évolution de l'activité enzymatique potentielle ; cependant, on a reconnu depuis longtemps, du moins qualitativement, que l'humidité est un facteur primordial de régulation de l'action des enzymes dans ces produits, et la dessiccation est fréquemment utilisée pour enrayer leur action néfaste.

C'est ainsi qu'on a pu relier à la teneur en eau des produits, l'activité des lipases et phosphates dans l'avoine (TAUFEL, 1944), des lipases et lécithinases dans les poudres d'œufs (BROOKS, 1943), des protéases au cours de la maturation des fromages (RAADSVELD, 1952).

Ce sont surtout les travaux de KIERMEIER et CODURO (1955) sur les amylases dans les farines de seigle et certains types de pains peu cuits, et plus récemment ceux de ACKER et LUCK (1958 *b*), (1959), de ACKER et KAISER (1959) sur les phospholipases des pâtes alimentaires aux œufs, qui ont apporté des indications plus précises sur l'influence de l'humidité relative dans le démarrage et l'évolution de l'activité de ces enzymes.

Leurs résultats les ont amené à étudier l'évolution de mélanges modèles que nous allons examiner maintenant plus en détail.

B. — Manifestations d'actions enzymatiques observées dans les mélanges artificiels

1° *Protéolyse.*

Dès 1948, VOLGUNOV, VOLGUNOV et POKHNO (1949) ont observé l'action de systèmes enzymatiques dans des mélanges artificiels en utilisant de la trypsine et des enzymes protéolytiques du pois absorbés sur du papier filtre, avec un substrat constitué par des peptones. Ils ont observé dans ces conditions, pour des humidités relatives de 75 à 91 p. 100, une protéolyse plus lente et notablement moins importante que dans des milieux aqueux. La dégradation aboutit à des valeurs constantes dans cette

zone d'humidité relative alors que l'action des amylases ou de l'invertase augmente en fonction de la teneur en eau. L'activité de l'eau nécessaire au démarrage de ces protéases n'a pas été précisée.

2° *Amylolyse.*

Les premiers travaux concernant ce problème ont été effectués par MASHKOVCEV, VOLGUNOV et POKHNO (1951) ; ils ont été suivis par les études de KIERMEIER et CODURO (1954 *a*). Les résultats obtenus par ces auteurs les amènent à conclure que la réaction amylasique ne démarre qu'à partir d'une teneur en eau déterminée. Ils émettent l'hypothèse suivant laquelle la réaction enzymatique ne peut avoir lieu que lorsqu'une partie de l'eau existant dans le substrat se trouve fixée dans les espaces capillaires ; elle serait favorisée par la présence de corps poreux, inertes vis-à-vis de l'action des amylases.

D'après les expériences de MASHKOVCEV et collaborateurs, effectuées à des humidités relatives de 60 à 95 p. 100, la présence, dans les capillaires du substrat, de substances hydrophiles telles que le glycérol, le chlorure de sodium et le chlorure de calcium, permet à l'enzyme de se manifester à plus basse humidité relative. Les auteurs concluent que l'humidité relative pour laquelle un enzyme cesse d'être actif ne dépend pas des caractéristiques spécifiques de l'enzyme, mais de la présence dans le milieu de cristalloïdes hydrophiles.

Les résultats obtenus par KIERMEIER et CODURO montrent, d'autre part, que la réaction s'arrête à des niveaux d'autant plus élevés que la teneur en eau du milieu est plus grande. Dans tous les cas où ils ont opéré en présence de « capillaires », ces auteurs ont constaté, au bout d'un certain temps, la disparition d'une certaine quantité de sucres réducteurs et ils formulent l'hypothèse d'une réaction de synthèse.

Pour des teneurs en eau supérieures à 35 p. 100, la vitesse de réaction augmente proportionnellement à la concentration en eau, puis reste constante à partir d'une teneur de 43 p. 100.

Ces travaux peuvent donner lieu à diverses critiques du fait que les conditions opératoires fixées ne permettent pas de fournir de précisions quant au type de dégradation réalisé, et laissent des doutes sur la validité de la comparaison des différents essais :

— la mesure, comme indice de l'activité enzymatique, du pouvoir réducteur résultant, ne peut renseigner sur l'évolution propre à chaque enzyme dans le mélange complexe d'amylases utilisé ;

— les substrats employés présentent, suivant leur origine et leur mode de préparation, une sensibilité plus ou moins grande aux amylases, ce dont les auteurs ne semblent pas avoir tenu compte ;

— l'utilisation de systèmes tampons, les concentrations relatives en amylases et amidon ne sont pas toujours précisées ;

— le séchage du mélange enzyme-substrat, au cours de la préparation des milieux, est réalisé assez lentement à température ordinaire, et il est vraisemblable qu'une dégradation plus ou moins importante se soit produite à ce stade, ce qui a pu modifier l'évolution des phénomènes ultérieurement étudiés ;

— l'activité « potentielle » de systèmes enzymatiques au début et à la fin des expériences n'a pas toujours été déterminée et l'on peut se demander si elle n'a pas évolué au cours des essais. La possibilité, par exemple, d'une destruction partielle

des enzymes au cours de la dessiccation à température ordinaire ou au cours de la conservation des préparations ne semble pas exclue.

Enfin, les différents aspects du problème de sorption de l'eau par les constituants du mélange n'ont pratiquement pas été abordés et leur incidence sur le développement des réactions enzymatiques n'a pas été examinée de façon approfondie. En outre, KIERMEIER et CODURO comparent des vitesses de réactions amylasiques de différents milieux pour une même teneur en eau, alors qu'on peut se demander si, en raison de l'affinité différente de divers constituants pour l'eau, la comparaison ne devrait pas être faite à une même humidité relative. Il est du reste possible que dans certaines expériences, l'état d'équilibre des milieux avec la tension de vapeur d'eau n'ait pas été atteint au moment des mesures.

3° *Hydrolyse enzymatique de la lécithine.*

Ce sont surtout les travaux récents de Acker et LUCK (1958)-(1959) et de ACKER et KAISER (1959) [1]qui apportent des précisions sur l'influence de l'humidité relative dans la dégradation de la lécithine par les phospholipases B et D.

Ils mettent en évidence, dans les conditions où ils ont opéré, l'existence d'un seuil d'humidité relative voisin de 45 p. 100 pour le démarrage de ces enzymes. Cette valeur correspond sensiblement au point de la courbe de sorption où la teneur en eau s'accroît très rapidement en fonction de l'humidité relative. Cependant, les résultats qu'ils obtiennent les amènent à admettre que d'autres enzymes ne pourraient se manifester que pour des hydratations nettement plus élevées.

Ils trouvent que la dégradation enzymatique atteint un palier d'autant plus élevé que l'humidité relative est plus grande, confirmant ainsi les indications de KIERMEIER et CODURO (1954 *a*) et les observations antérieures de CUENDET et *al.* (1954) et de ROTHE (1955). Ils précisent que ce fait n'est pas dû à une inactivation de l'enzyme.

En conclusion : Ainsi que nous venons de le voir, les observations effectuées sur le rôle de l'eau dans l'évolution des actions enzymatiques en milieu complexe ne permettent généralement pas de connaître, pour un enzyme déterminé, le seuil d'activité de l'eau à partir duquel il réagit et la cinétique de son action en fonction de l'hydratation. De même, l'influence respective de l'affinité pour l'eau de chaque constituant du milieu sur le déclenchement de l'attaque enzymatique n'est pas suffisamment précisée.

Les travaux de MASHKOVCEV et *al.*, de KIERMEIER, en particulier ceux sur l'action des amylases en milieux synthétique solide, sont sujets à certaines critiques, comme nous l'avons indiqué.

Les recherches récentes de ACKER apportent des précisions sur les relations existant entre l'action des phospholipases et l'affinité pour l'eau du milieu. Cependant, certains faits restent obscurs, tels que :

— l'influence de la présence de cristalloïdes, (glycérine, NaCl, $CaCl_2$ par exemple), et de chaque constituant du milieu en fonction de leur affinité pour l'eau ;

[1] Nous n'avons pu avoir connaissance de ces travaux publiés en 1958, qu'après avoir entrepris nos recherches.

— l'existence, évoquée par KIERMEIER, d'une réaction réversible dans le cas des amylases en milieu peu hydraté ;

— en outre, on peut se demander dans quelle mesure les résultats obtenus avec tel type de réaction enzymatique peuvent être généralisés à d'autres et comment intervient la température.

C'est dans le but d'élucider au moins partiellement ces problèmes que nous avons entrepris de nouvelles recherches sur le comportement des amylases alpha et bêta, dans les milieux aussi simples que possible, avec des conditions expérimentales soigneusement précisées, en fonction de l'humidité relative, pour les températures de de 21 et 31° C.

Nous avons été amenés à choisir ces enzymes et le substrat amidon pour les raisons suivantes :

a) les actions de l'alpha et de la bêta amylase, en solution, sur l'amylose et l'amylopectine et même sur l'empois d'amidon ont fait l'objet d'études approfondies et on commence à bien connaître leurs mécanismes. L'essentiel de nos connaissances dans ce domaine a été indiqué dans un exposé que nous avons fait en 1961, (DRAPRON, 1961 *b*), à partir des travaux de BERNFELD (1951), BADENHUIZEN (1958, 1960) WHELAN (1958).

Tout récemment, WHELAN (1960), et FRENCH (1960), ont présenté d'intéressantes mises au point sur ce sujet.

b) Les polyholosides constituant l'amidon sont parmi ceux dont la structure chimique est la mieux connue, et on a également des idées assez précises sur la structure du granule d'amidon, sur les interactions des chaînes macromoléculaires, soit entre elles, soit avec l'eau. En particulier, au sujet de la connaissance de l'état et du rôle de l'eau dans l'amidon, des contributions importantes ont été fournies par les études de sorption, de spectres hertziens et de diffraction des rayons X.

Ces différents aspects ont fait dernièrement l'objet d'une mise au point par GUILBOT (1961 *a*).

c) l'amylolyse est un processus important, aussi bien dans les phénomènes de germination et la conservation des graines que dans les transformations technologiques. De plus, au cours du stokage des grains, en malterie, en panification, elle intervient dans des milieux d'hydratation voisine de celles que nous envisageons d'étudier.

Au cours de notre travail nous avons tout d'abord été amené à définir des méthodes de préparation des milieux, telles que la cryodessiccation, permettant de conserver au substrat et à l'enzyme leur quasi-intégrité et limitant au minimum la dégradation du substrat avant examen. L'affinité pour l'eau du mélange et de ses composants a été étudiée. La cinétique des actions enzymatiques a été suivie par l'analyse des constituants du milieu, après blocage de l'enzyme, soit par fractionnement classique utilisant les caractères de solubilité, soit par chromatographie de partage sur papier.

L'exposé détaillé des techniques utilisées et des recherches réalisées va faire l'objet des chapitres suivants. Les résultats obtenus seront discutés :

— d'une part, par rapport à nos connaissances sur l'état de l'eau et la structure des milieux peu hydratés et sur l'action des amylases en milieu liquide ;

— d'autre part, par rapport aux travaux antérieurs et aux conclusions formulées par les auteurs précédents sur les processus enzymatiques en milieu peu hydraté.

TRAVAUX PERSONNELS

DÉGRADATION DE L'AMIDON PAR LES AMYLASES EN FONCTION DE L'ACTIVITÉ DE L'EAU ET DE LA TEMPÉRATURE

I. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

A. — Matériel d'étude

1° *Amylases.*

Au moment où nous avons entrepris ce travail, il ne nous a pas été possible d'utiliser des enzymes cristallisés, bien que cela ait pu paraître souhaitable. Nous nous sommes adressés à des préparations purifiées et stabilisées, fournies par la

TABLEAU 3

Caractéristiques des préparations enzymatiques.

	β amylase	α amylase
pH optimum d'action	4,0-6,0 à 30-50°C	7,0 à 75°C
pH d'inactivation		< 5
Température d'inactivation	65°C	encore active à 100°C
Activité : produit tel quel	143 mg de maltose/mn/mg N	625 unités S. K. B./mg N
Activité : après dialyse	50,7 g de maltose/mn/mg N	(SANDSTEDT, KNEEN et BLISH, 1939-1957)
Activité : après électrodialyse	10,3 mg de maltose/mn/mg N exempte d'α amylase	totalement inactive exempte de β amylase
Analyse, p. 100 de la substance sèche		
Eau	2,0	2,0
Matières minérales (1)	87,4	90,5
NH_3	0,02	
Chlorures (en ClNa)	0,05	
Phosphore	0,2	
Sulfates (en $SO_4^=$) (2)	53,8	
Azote total : produit tel quel	1,40	0,40
Azote total : après dialyse	6,85	
Azote total : après électrodialyse	7,75	6,10
Sucres totaux (exprimés en glucose)		
produit tel quel	6,10	1,17
après dialyse (3)	32,90	

(1) Cendres obtenues par incinération à 550°C.

(2) Le spectre de diffraction aux rayons X des produits initiaux présente des raies très intenses dont la position est caractéristique de la présence de sulfate de sodium anhydre, ce qui nous permet de considérer ce sel comme l'un des principaux constituants du mélange.

(3) L'examen chromatographique du produit hydrolysé montre la présence de glucose et de pentoses.

National Biochemical Corporation ; la bêta amylase est extraite du malt, l'alpha amylase est d'origine bactérienne ; toutes deux sont diluées avec un mélange de sels constitué d'après les indications du fournisseur, de phosphates, de chlorures et de sulfates (1).

Ces préparations enzymatiques ont présenté les caractéristiques rassemblées dans le tableau 3.

2° *Substrat.*

Nous avons utilisé dans ce travail, l'amidon plutôt que ses constituants séparés (amylose et amylopectine) pour les raisons suivantes :

— d'une part, à cause des objectifs que nous nous sommes fixés : détermination du seuil de l'activité de l'eau à partir duquel commence l'amylolyse et comparaison de la cinétique de dégradation en fonction de la teneur en eau, par rapport à celle observée en solution ;

— d'autre part, afin de rester dans des conditions proches de la pratique et pour ne pas accumuler les difficultés expérimentales.

Cependant, avec le grain d'amidon non lésé, la bêta amylase est pratiquement sans action et l'alpha amylase n'agit que très lentement (SANDSTEDT, 1941-1946). De plus, les empois obtenus par chauffage de suspensions aqueuses d'amidon, « rétrogradent » très facilement et présentent alors une sensibilité relativement faible vis-à-vis des amylases (VOLZ et RAMSTAD, 1952) ; (MEYER et BERNFELD 1940, 1949, 1952).

C'est pourquoi nous nous sommes adressés à des préparations d'amidons « solubles », substrats classiques, employés depuis longtemps pour l'évaluation de l'activité des amylases.

Ces produits, obtenus selon LINTNER (1886, 1888), spécialement à partir d'amidon de pomme de terre, par traitement aux acides forts dilués (HCl 0,2 N.) aux environs de 20°C, présentent un pouvoir réducteur relativement faible vis-à-vis de la liqueur de FEHLING. Ils sont partiellement solubles dans l'eau froide, solubles à chaud en donnant une solution légèrement opalescente, la rétrogradation n'apparaissant qu'au bout de plusieurs heures vers la température de 20°C.

Les travaux de COWIE et GREENWOOD (1957, 1958) ont montré qu'au cours du traitement préconisé par LINTNER, l'hydrolyse subie est très faible et, selon MYRBÄCK (1954), la variation dans des limites assez larges des conditions de traitement par les acides (durées et concentrations) ne modifient pas de façon sensible la cinétique des actions amylasiques ultérieures, mesurées par l'évolution du pouvoir réducteur.

Dans la majorité des expériences que nous avons effectuées, nous avons utilisé un amidon LINTNER préparé par MERCK (référence 1252) ; il présente des caractéristiques sensiblement constantes d'un échantillon à l'autre ; le pouvoir réducteur, exprimé en glucose, représente moins de 0,6 p. 100 et, par chromatographie sur papier, on ne peut mettre en évidence que des traces de glucose représentant moins de 0,01 p. 100 du produit.

(1) Comme nous l'indiquerons par ailleurs, nous nous sommes efforcés de tenir compte de l'influence des sels sur les résultats obtenus au cours de cette étude. De toute façon, il convient de noter que même à l'état cristallisé, les enzymes renferment des sels en quantité non négligeable.

3° *Maltose.*

Nous avons employé du maltose HOFFMANN-LAROCHE cristallisé avec une molécule d'eau. Le dosage de l'eau effectué sur plusieurs échantillons montre que ces derniers contiennent généralement une quantité d'eau supérieure à celle correspondant au monohydrate (au maximum 6,40 au lieu de 5,26 p. 100).

Un contrôle de la pureté du produit a été effectué par chromatographie sur papier.

B. — Techniques utilisées et mises au point

OBTENTION DES MÉLANGES ENZYMES-SUBSTRAT A L'ETAT SEC

Au cours de ce travail, nous n'avons pas étudié l'influence de la concentration de l'enzyme par rapport à l'amidon sur l'amylolyse ultérieure. Nous nous sommes placés à des concentrations relativement élevées dans le but de pouvoir déceler plus facilement le début d'apparition des produits de dégradation en fonction de l'humidité relative.

L'examen des travaux antérieurement effectués sur l'action des amylases en milieu synthétique a montré qu'une des techniques les plus délicates à mettre en œuvre était la préparation du mélange enzyme-substrat, bien que les auteurs n'y aient pas toujours attaché suffisamment d'importance (MASHKOVCEV et *al.*, 1951) ; (KIERMEIER et CODURO, 1954 *a*). Au cours du mélange effectué à l'état pâteux et du séchage réalisé à température ordinaire, une dégradation non négligeable se produit, qui peut influer très sensiblement sur les résultats de l'expérimentation ultérieure. C'est dans le but de limiter le plus possible la dégradation enzymatique au cours de ces opérations que nous avons été amenés à effectuer la préparation des mélanges enzyme-substrat, soit à basse température, soit à partir des constituants déshydratés, selon les modes opératoires suivants :

1°) *Préparation du mélange enzyme-substrat à partir de leurs solutions.*

a) *Préparation et mélange des solutions.*

α) *Dissolution du substrat.* — A 90 ml d'eau déminéralisée (1), ajouter progressivement, en évitant d'arrêter l'ébullition, une suspension de 5 g. d'amidon soluble (en substance sèche) dans 10 ml d'eau froide. Agiter continuellement en maintenant l'ébullition pendant 5 minutes. Ramener rapidement la température de la préparation vers 20°C en agitant, de façon à empêcher la formation d'une peau en surface ; compléter le volume total à 100 ml.

β) *Dissolution de l'enzyme.* — Dissoudre 0,250 g de la préparation enzymatique dans 25 ml d'eau déminéralisée.

γ) *Mélange de l'enzyme et du substrat.* — Placer dans un grand cristallisoir calorifugé extérieurement, un vase cylindrique en métal, d'environ 150 cm^2 de surface utile ; amener l'ensemble vers 0°C ainsi que les solutions d'enzyme et de substrat.

(1) Au cours de ces préparations, nous avons utilisé de l'eau passée sur échangeur d'ions de façon à éliminer les ions Cu^{++}, susceptibles d'inhiber les amylases.

Transvaser une fraction de 25 ml du substrat dans le récipient métallique et en agitant ce dernier, y verser rapidement une quantité d'enzyme correspondant à la concentration désirée ; en même temps, répandre de l'azote liquide dans les deux récipients. En raison de la caléfaction, la congélation du mélange demande environ une minute, ce qui permet l'homogénéisation préalable de l'enzyme et du substrat. Le mélange solide, dont la température s'abaisse très rapidement est concassé, puis placé dans des flacons à large ouverture, maintenus à — 80°C.

b) *Déshydratation du mélange.*

α) *Principe de la méthode employée.* — La technique la mieux adaptée à la déshydratation est la cryodessiccation, encore dénommée lyophilisation pour rappeler la remarquable capacité de réhydratation des produits obtenus.

Cette méthode basée sur l'élimination de l'eau par sublimation de la glace sous vide poussé, permet de se maintenir à une température suffisamment basse pour éviter toute réaction enzymatique ou chimique. En outre, grâce à ces conditions de séchage, la contraction de volume du produit, la migration des solutés sont éliminées, dans la mesure où la température du produit reste inférieure à celle de l'eutectique le plus bas des constituants du mélange ; la réhydratation ultérieure est très rapide en raison de la structure poreuse de la substance ; l'activité potentielle des enzymes n'est généralement pas amoindrie (LAIDLAW et WYLAM, 1952) ; (GUILBOT, 1957).

Les détails d'utilisation de cette technique dans le cas des produits biologiques et alimentaires ont été indiqués dans diverses mises au point (GUILBOT, 1957) ; (HARPER et TAPPEL, 1957).

β) *Appareillage.* — L'appareil que nous avons utilisé a été construit au laboratoire, en s'inspirant des installations réalisées à l'hôpital Percy par le Colonel HENAFF.

Il se compose essentiellement :

— d'une enceinte de sublimation à plateaux sur lesquels sont placés les flacons contenant le produit à déshydrater. On peut régler la température de ces plateaux de − 35 à + 50°C au moyen d'un groupe frigorifique et de résistances électriques, et la contrôler à l'aide de thermocouples ;

— d'un condenseur de vapeur d'eau, constitué, soit d'une paroi refroidie à − 80°C par un mélange acétone-glace carbonique, soit d'un piège à anhydride phosphorique permettant d'abaisser la tension de vapeur d'eau vers 10^{-5} mm de mercure et de déshydrater plus complètement les produits. Ce condenseur est situé dans le circuit, entre l'enceinte de sublimation et la pompe à vide ;

— d'une pompe à palettes à deux étages et à lest d'air, permettant de réaliser dans l'enceinte, en fin d'opération, une pression de l'ordre de $3 \cdot 10^{-3}$ mm de mercure, avec un débit de 0,5 m^3/h ;

— d'une jauge thermique permettant, par un système de vannes, la mesure du vide soit au niveau du condenseur, soit au niveau de l'évaporation, ce qui renseigne sur l'évolution de la déshydratation.

γ) *Mode opératoire.* — Placer les flacons contenant le mélange congelé enzyme-substrat sur les plateaux préalablement amenés vers — 35°C. Le condenseur à paroi froide étant en ordre de marche, faire le vide dans l'appareil. La pression de sublimation s'établit après un certain temps vers $2 \cdot 10^{-2}$ mm de mercure et, au fur et à mesure du séchage, s'abaisse progressivement vers 6 à $7 \cdot 10^{-3}$ mm de mercure.

Remplacer alors le condenseur par le piège à anhydride phosphorique en maintenant le vide dans l'enceinte de sublimation. En fin d'opération, faire remonter progressivement la température jusque vers 0°C, arrêter le pompage et revenir à pression atmosphérique par introduction d'azote sec. Boucher rapidement les flacons et les laisser se mettre en équilibre thermique avec le laboratoire.

c) *Conditionnement et caractéristiques du mélange enzyme-substrat séché.*

Le produit sec, de structure fibreuse et de volume apparent comparable à celui du produit congelé, est dispersé et homogénéisé au moyen d'un broyeur du type « Turmix » en opérant sous atmosphère d'azote déshydraté, puis stocké sous azote vers 0°C dans des flacons bouchés hermétiquement, la teneur en eau résiduelle étant de l'ordre de 2 à 3 p. 100.

Avec la technique ainsi précisée, dans le cas du milieu « bêta amylase »-substrat (à la concentration préparation enzymatique/substrat = 5 p. 100), il ne se forme qu'une quantité de maltose de l'ordre de 2 à 3 p. 100. Nous avons vérifié que ce début de dégradation ne se produit qu'au cours du mélange des solutions avant la congélation, la teneur en maltose du mélange congelé étant la même que celle du produit déshydraté.

Les spectres de diffraction de rayons X des mélanges obtenus sont caractéristiques de l'état amorphe.

2° *Préparation du mélange enzyme-substrat à partir des produits secs.*

Dans certains cas, en particulier avec l'alpha amylase, nous avons été amenés à effectuer le mélange à partir des produits secs.

a) *Cryodessiccation des solutions.*

Dans ces conditions, les solutions (à la concentration de 5 p. 100) des différents constituants du mélange sont réparties dans des flacons par fractions représentant les 2/5 du volume des récipients et congelées vers — 60 — 70°C(mélange alcool-neige carbonique) par la méthode de congélation-rotation horizontale qui permet la répartition du liquide en couche mince pour faciliter l'évaporation ultérieure.

Le séchage est effectué par la méthode de cryodessiccation précédemment décrite.

Ce mode de congélation et de dessiccation a également servi à préparer les composants du milieu réactionnel y compris le maltose à l'état amorphe, dans la mesure où cela s'est avéré nécessaire pour la conduite des essais.

b) *Mélange des produits secs.*

La préparation amylasique et l'amidon ainsi cryodéshydratés présentent des surfaces spécifiques très importantes ; en les mélangeant dans un rapport de 1 à 10 et en les dispersant sous azote sec à l'aide d'un broyeur type « Turmix », on obtient un produit d'homogénéité suffisante pour les essais ultérieurs.

Les préparations ainsi obtenues sont stockées dans les conditions précédemment précisées pour les mélanges réalisés à partir des solutions.

Techniques de réhydratation en phase vapeur

1° *Méthode de sorption.*

Dans le but, d'une part de déterminer les isothermes de sorption des constituants des milieux réactionnels, soit séparés, soit en mélange ; d'autre part, d'amener et de maintenir les milieux enzyme-substrat en équilibre avec des atmosphères de température et d'humidité relative bien définies pour examiner l'évolution de l'amylolyse, nous avons utilisé la méthode suivante :

a) *Description de la technique.*

α) *Principe.* — On laisse réhydrater les échantillons secs, jusqu'à ce qu'ils atteignent leur état d'équilibre, à température constante, avec une tension de vapeur d'eau déterminée.

β) *Matériel et réactifs.*

— Étuve ou bain thermostatique permettant d'obtenir une isothermie à ± 0,2°C près.

— L'appareillage étanche mis au point par Guilbot et par nous-mêmes (1950-1957) ; (1960) ; (1961*b*), pour l'étude de la sorption de l'eau par l'amidon et ses dérivés

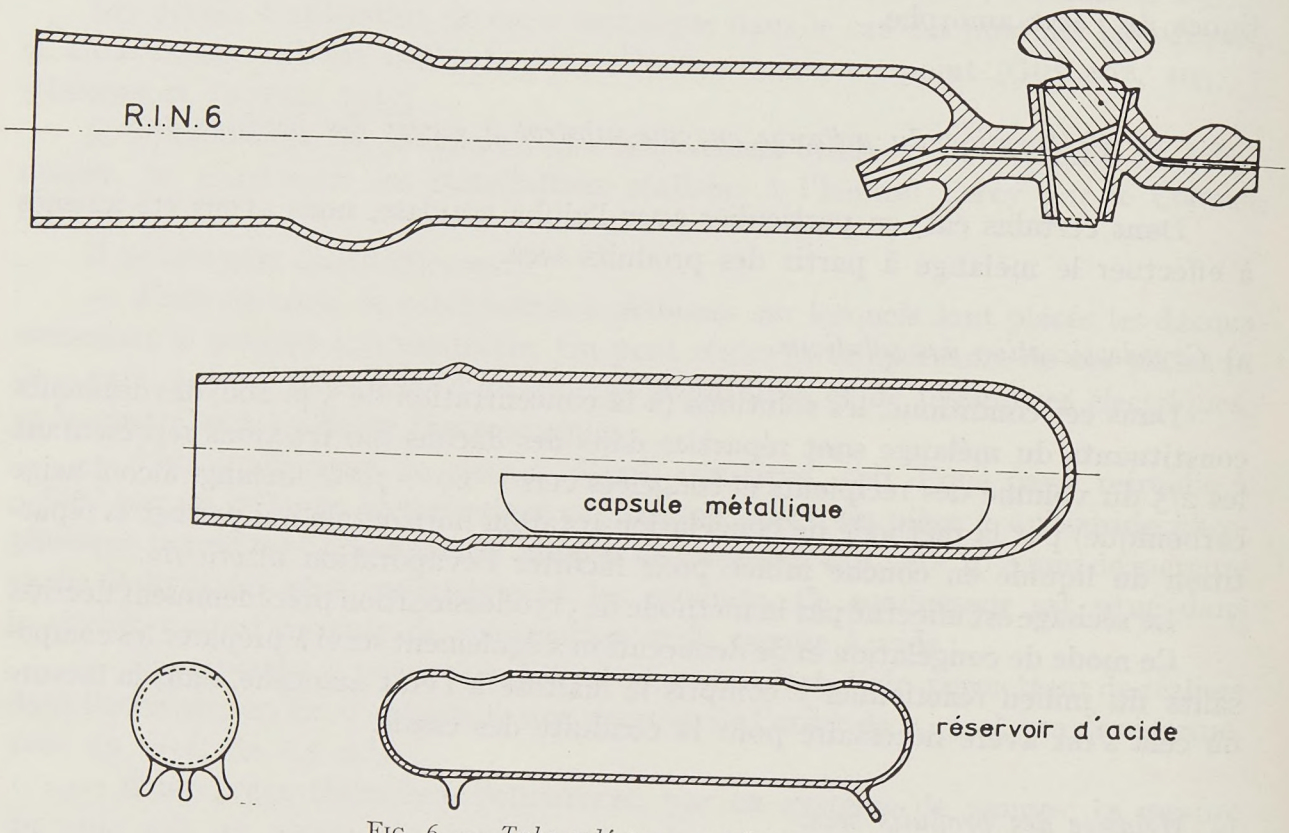


Fig. 6. — *Tube rodé pour sorption sous vide.*

est constitué : soit de boîtes de Roux d'un litre, équipées d'un faux fond et obturées par un bouchon de caoutchouc légèrement graissé ; soit de tubes rodés fermés à une extrémité et portant à l'autre un ajutage permettant de faire le vide, munis de petits réservoirs de forme cylindrique présentant deux orifices à leur partie supérieure (fig. 6).

— Solutions d'acide sulfurique de concentrations diverses dont le titre est déterminé, soit par acidimétrie, soit par densité et dont les tensions de vapeur sont calculées d'après les tables de constantes (PERRY, 1941).

γ) *Mode opératoire.* — Peser, sur une balance sensible au 1/100 de mg [1], 0,1 à 0,5 g de produit dans une capsule métallique, munie d'un couvercle, préalablement séchée et tarée. Placer, si nécessaire, les prises d'essai dans un dessiccateur, en présence d'anhydride phosphorique, à température ordinaire, sous une pression de l'ordre de 15 à 20 mm de mercure pour amener leur teneur en eau résiduelle en dessous de 0,5 p. 100. Cette précaution est nécessaire, surtout pour la détermination des isothermes de sorption, afin d'éviter d'avoir une courbe intermédiaire entre la sorption et la désorption.

Le matériel et les solutions étant à température convenable, introduire dans les récipients à sorption les solutions d'acide sulfurique (soit environ 50 ml dans les fioles de ROUX et 5 ml dans les réservoirs à deux orifices des tubes à sorptions) et les nacelles contenant les prises d'essai.

En opérant rapidement, boucher hermétiquement dans le cas des soıptions à pression atmosphérique en fioles de ROUX ; dans le cas de l'emploi des tubes à sorption, faire le vide au préalable à l'aide d'une trompe à eau.

Placer les récipients dans un thermostat approprié et laisser s'établir l'équilibre, ce qui demande au maximum 10 à 12 jours à la pression atmosphérique et quelques heures sous vide partiel.

Retirer ensuite les récipients des thermostats, les ramener à pression ordinaire si nécessaire, sortir la capsule contenant l'échantillon, la couvrir, la peser ; effectuer :

— soit le dosage de l'eau à 50°C sous vide en présence d'anhydride phosphorique, selon la méthode préconisée par GUILBOT (1949) ; (1958 *a*) ;

— soit des prélèvements pour suivre l'action des amylases.

En fin d'expérience, on prélève une partie aliquote de la solution d'acide sulfurique utilisée pour en déterminer le titre final au moment de l'équilibre.

b) *Remarques justificatives.*

α) L'appareillage que nous avons utilisé, outre une extrême simplicité, présente divers avantages :

En raison de leur forme, les boîtes de ROUX permettent :

— d'avoir une grande surface d'échange entre la solution et l'atmosphère ;

— de disposer l'échantillon à quelques centimètres au-dessus de cette surface, en réduisant ainsi au minimum les erreurs dues au gradient de concentration en vapeur d'eau (PACAUD, 1952) ;

— de pouvoir placer dans le même récipient jusqu'à 7 échantillons qui se trouvent dans des conditions très comparables ;

— de sortir les échantillons sans perturber sensiblement l'atmosphère, grâce à leur étroite ouverture.

Par contre, il n'est pas possible de faire le vide dans ces flacons et le temps mis pour obtenir l'équilibre reste relativement important.

C'est afin de remédier à cet inconvénient, soit pour la mesure de l'activité de la bêta amylase en fonction du temps, soit pour éliminer aux hautes humidités

[1] Pour obtenir une précision de l'ordre du 1/10 de mg.

relatives les risques de développement de microorganismes, que nous avons également utilisé les tubes à sorption. Dans ceux-ci, la cuve réservoir d'acide de forme cylindrique n'est pas complètement ouverte à sa partie supérieure pour éviter les projections lors de la mise sous vide par suite du dégazage, mais les deux orifices dont elle est munie ont une dimension suffisante pour ne pas freiner de façon importante la diffusion de la vapeur d'eau. De plus, pour aider cette diffusion vers le produit à étudier, la cuve est placée à proximité immédiate et sur le même plan que la capsule contenant l'échantillon.

β) Pour obtenir des tensions de vapeur d'eau déterminées, nous avons préféré l'emploi de solutions d'acide sulfurique à celui des solutions saturées de sels :

— d'une part, parce qu'il est possible d'obtenir ainsi toute la gamme des humidités relatives désirées,

— d'autre part, parce que la loi de variation, en fonction de la température, de la tension relative de vapeur d'eau de ces solutions est connue dans la gamme des températures qui nous intéresse, ce qui n'est pas toujours le cas pour les solutions saturées.

Les résultats obtenus dans les études de sorption de l'amidon et de ses dérivés ont permis d'éprouver la validité de cette méthode.

γ) Sous la pression atmosphérique, nous avons vérifié que l'équilibre est obtenu au bout de 8 jours environ, et par mesure de sécurité, nous avons prolongé la durée à 10 ou 12 jours. Ce temps est amplement suffisant, d'autant plus que nous avons constaté généralement que pour les produits cryodéshydratés, l'équilibre est pratiquement atteint au bout de 2 à 3 jours, en raison de la diffusion rapide de la vapeur d'eau à l'intérieur de la masse poreuse.

δ) Sous vide, le temps de mise en équilibre des tensions de vapeur se réduit à 4 à 5 heures. Pour les mesures de sorption, cette durée a été prolongée pour plus de sécurité jusqu'à 72 heures. Dans ce cas, le vide est effectué à l'aide de la trompe à eau pendant un temps suffisamment court (5 minutes) pour éviter toute concentration importante de la solution d'acide sulfurique.

2° *Conditions opératoires en vue de l'étude de l'amylolyse en fonction de l'activité de l'eau.*

Ces conditions sont dans l'ensemble très comparables à celles que nous venons de décrire dans le paragraphe précédent ; cependant, nous avons été amenés à modifier certaines modalités du protocole expérimental.

L'étude de l'évolution de l'action enzymatique en fonction du temps nécessite en effet d'effectuer de nombreux prélèvements sur un même mélange enzyme-substrat maintenu à la même humidité relative et de déterminer, sur chacun d'eux, la teneur en eau et en produits de dégradation. En outre, pour assurer au produit, dans la mesure du possible, des conditions permettant une fixation d'eau homogène et reproductible, il n'est pas possible de mettre en œuvre dans un même essai de grandes quantités de produit.

Plusieurs techniques ont été utilisées :

a) Certaines expériences ont été effectuées avec des séries de prises d'essai placées à la même humidité relative dans des tubes différents ; pour chaque prélèvement, on utilise une quantité de produit (0,1 à 0,3 g.) dont une partie aliquote sert au dosage de la teneur en eau, et l'autre à l'extraction des produits résultant de l'action enzymatique. Nous avons remarqué que, toutes conditions égales, la vitesse de réaction varie cependant parfois d'un échantillon à l'autre, en raison de perturbations dans la diffusion de la vapeur d'eau.

b) Le deuxième mode opératoire consiste à placer deux prises d'essai dans la même enceinte, de façon symétrique par rapport à la source de vapeur et, simultanément, à suivre sur l'une d'elles l'évolution de la teneur en eau et à prélever sur l'autre des fractions aliquotes pour doser les produits de dégradation en fonction du temps.

c) Un troisième mode opératoire permet d'opérer sur un même échantillon : connaissant la teneur en eau initiale, on peut suivre l'évolution de l'hydratation par pesée avant et après chaque prélèvement destiné au dosage des produits de la réaction enzymatique ; ceci suppose que la prise d'essai initiale soit effectuée sans reprise d'eau et que les prélèvements ultérieurs se fassent sans pertes de produit.

Dans la deuxième et la troisième méthode :

— d'une part, la nécessité de refaire un vide partiel après chaque prélèvement peut provoquer des variations de concentration, et par conséquent de tension de vapeur d'eau de la solution d'acide sulfurique ;

— d'autre part, ces manipulations répétées risquent de perturber, dans une certaine mesure, l'équilibre thermique dans les expériences effectuées à 31°C ; cet inconvénient est pratiquement négligeable pour les déterminations faites à 21°C, le laboratoire étant toujours maintenu vers cette température.

En fait, aucun des modes opératoires n'est absolument satisfaisant et il est parfois nécessaire, pour de plus de sécurité, de procéder à des recoupements en les utilisant conjointement pour chaque expérience. Au cours de la discussion ultérieure, nous examinerons la répercussion de ces difficultés expérimentales sur les déductions qu'il est possible de tirer des résultats obtenus.

En résumé, les difficultés les plus importantes résident :

— dans l'obtention d'une vitesse de réhydratation strictement constante d'un échantillon à l'autre pour des conditions de température et d'humidité relative identiques,

— dans les variations d'équilibre thermique qui peuvent influer, particulièrement à 31°C, sur la cinétique enzymatique.

Nous pensons que pour des recherches ultérieures une solution devrait être recherchée dans l'emploi d'un appareillage inspiré des cellules à diffusion de CONWAY, dans lequel le produit serait disposé de façon symétrique par rapport à la source de vapeur, afin d'obtenir une hydratation rapide et homogène. Il conviendrait de ne faire qu'une détermination par prise d'essai et d'obtenir l'équilibre thermique du système avant la mise en présence du produit avec la vapeur.

Isolement et dosage des produits formés en cours d'amylolyse

1° *Blocage de la réaction enzymatique, extraction des produits de dégradation.*

Cas des mélanges amidon-bêta amylase.

Dans la plupart des essais, nous avons bloqué l'action de l'enzyme par l'éthanol à 80 p. 100 à l'ébullition. Selon Kiermeier (1954 *a*), une solution aqueuse d'ions Ag^+ provoque également l'inhibition totale de la bêta amylase et nous avons été amenés à utiliser cette propriété dans certains cas.

C'est une technique classique que de « stabiliser » un matériel biologique par de l'alcool bouillant à 80 p. 100. Cette solution est considérée de plus comme un bon solvant de nombreux constituants biochimiques, en particulier des oses et des oligoholosides tels que ceux résultants de l'hydrolyse de l'amidon et contenant jusqu'à 8-10 unités glucose en chaîne.

A notre connaissance, aucune étude systématique n'a été effectuée sur l'extraction des sucres dans ces conditions ; c'est pourquoi nous avons examiné les modalités de l'extraction quantitive, par une solution éthanolique en fonction de sa concentration (de 65 à 95 p. 100), des mélanges cryodesséchés, soit d'amidon soluble et de maltose (teneur en maltose anhydre : 9,40 p.100 du mélange sec), soit d'amidon natif et de maltose (teneur en maltose anhydre : 15,56 p.100 du mélange sec). Les produits sont dispersés à une concentration de 3 à 4 p.1 000 dans l'alcool bouillant ; après avoir amené à volume connu et centrifugé, on dose les sucres, sur une partie aliquote de la solution, au moyen de la méthode de Dubois qui sera décrite ultérieurement.

Les résultats obtenus sont indiqués dans la figure 7.

La courbe 2 représente les quantités de sucres extraits (exprimées en maltose) à partir du mélange cryodesséché amidon soluble-maltose en fonction de la concentration alcoolique du milieu. Elle présente une amorce de palier pour des concentrations en alcool situées entre 80 et 90 p. 100, le chiffre théorique étant obtenu entre 80 et 85 p. 100.

Il est à remarquer que dans l'alcool ayant un titre supérieur à 90 p. 100, la dissolution du maltose est très incomplète. Nous avons pu constater par ailleurs que la solubilité du maltose dans l'éthanol à 95 p. 100 est 60 fois plus faible en présence d'amidon soluble. Tableau 4.

TABLEAU 4

Solubilité du maltose dans l'éthanol à 95 p. 100, à 20°C.

	g. p. 100 ml
Maltose cryodesséché	1,5
Maltose cryodesséché en présence d'amidon soluble.....	0,025

Par contre, au-dessous de 80 p. 100, la quantité de sucres extraits s'accroît rapidement. Nous avons examiné dans les mêmes conditions expérimentales, la

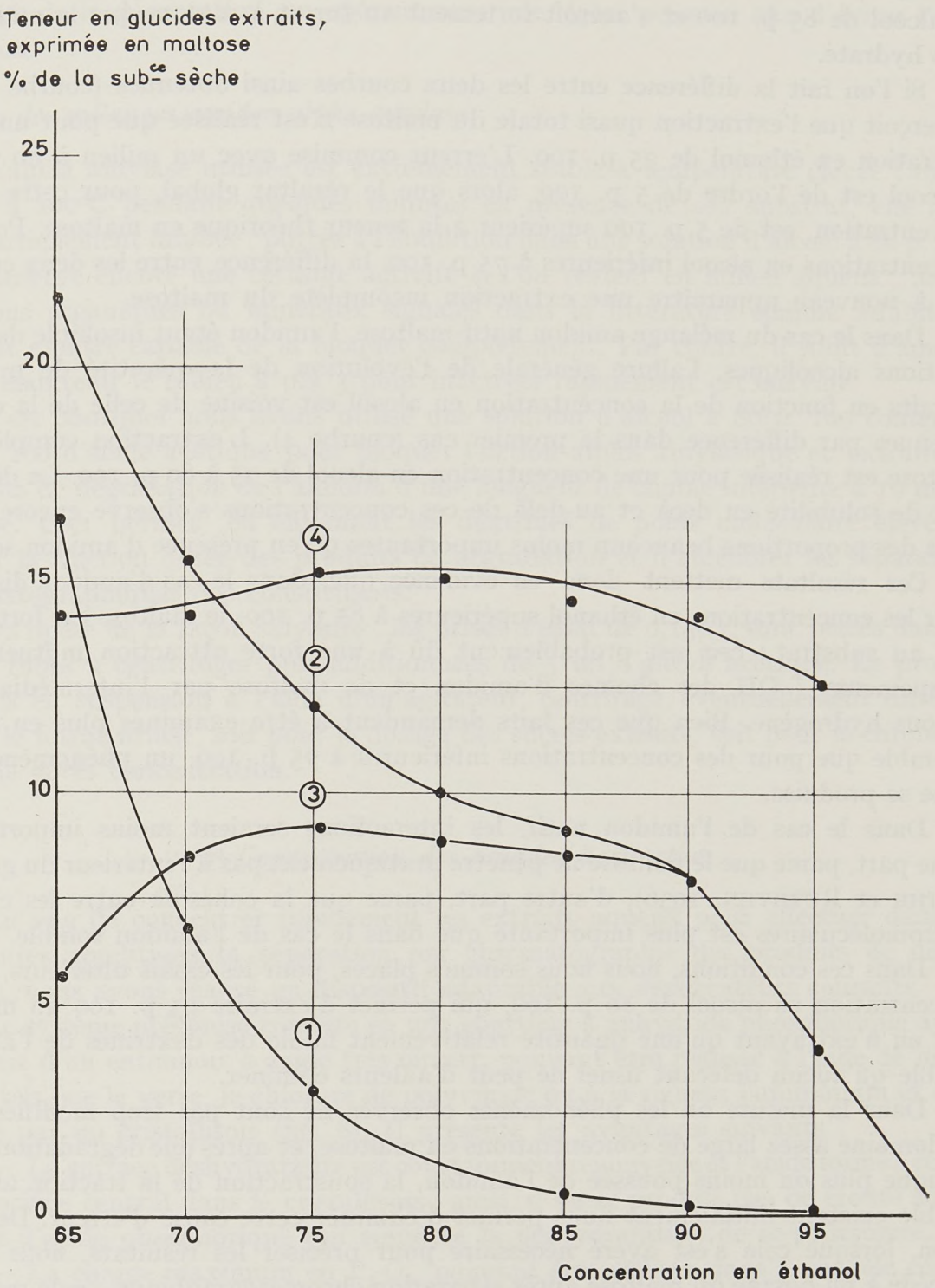


FIG. 7. — *Extraction des sucres à partir de différents milieux, en fonction de la concentration en alcool.*

Courbe 1 : Amidon soluble cryodéshydraté.
Courbe 2 : Mélange cryodéshydraté amidon soluble-maltose.
Courbe 3 : Courbe résultant de la différence entre 1 et 2 (maltose).
Courbe 4 : Mélange cryodéshydraté amidon natif-maltose.

solubilité de l'amidon LINTNER cryodéshydraté ayant servi à la préparation du mélange (courbe 1) ; elle commence à se manifester à partir d'une concentration en alcool de 85 p. 100 et s'accroît fortement au fur et à mesure que le milieu est plus hydraté.

Si l'on fait la différence entre les deux courbes ainsi obtenues (courbe 3), on s'aperçoit que l'extraction quasi totale du maltose n'est réalisée que pour une concentration en éthanol de 75 p. 100. L'erreur commise avec un milieu à 80 p. 100 d'alcool est de l'ordre de 5 p. 100, alors que le résultat global, pour cette même concentration, est de 5 p. 100 supérieur à la teneur théorique en maltose. Pour des concentrations en alcool inférieures à 75 p. 100, la différence entre les deux courbes fait à nouveau apparaître une extraction incomplète du maltose.

Dans le cas du mélange amidon natif-maltose, l'amidon étant insoluble dans ces solutions alcooliques, l'allure générale de l'évolution de la quantité de produits extraits en fonction de la concentration en alcool est voisine de celle de la courbe obtenues par différence dans le premier cas (courbe 4). L'extraction complète du maltose est réalisée pour une concentration en alcool de 75 à 80 p. 100. La diminution de solubilité en deçà et au-delà de ces concentrations s'observe encore, mais dans des proportions beaucoup moins importantes qu'en présence d'amidon soluble.

Ces résultats mettent donc en évidence que, dans le cas d'amidon dispersé, pour les concentrations en éthanol supérieures à 85 p. 100, le maltose est fortement fixé au substrat ; ceci est probablement dû à une forte attraction mutuelle des groupements —OH des chaînes d'amidon et de maltose par l'intermédiaire de liaisons hydrogène. Bien que ces faits demandent à être examinés plus en détail, il semble que pour des concentrations inférieures à 75 p. 100, un phénomène analogue se produise.

Dans le cas de l'amidon natif, les interactions seraient moins importantes, d'une part, parce que le maltose ne pénètre pratiquement pas à l'intérieur du granule (LATHE et RUTHVEN, 1956), d'autre part, parce que la cohésion entre les chaînes macromoléculaires est plus importante que dans le cas de l'amidon soluble.

Dans ces conditions, nous nous sommes placés, pour les essais ultérieurs, à une concentration en alcool de 80 p. 100, qui permet d'extraire 95 p. 100 du maltose tout en n'extrayant qu'une quantité relativement faible des dextrines de l'amidon soluble qu'aucun défécant usuel ne peut d'ailleurs éliminer.

Dans la mesure où les phénomènes observés ne sont pas trop modifiés dans un domaine assez large de concentrations en maltose, et après une dégradation enzymatique plus ou moins poussée de l'amidon, la soustraction de la fraction alcoolosoluble existant initialement nous permet d'éliminer cette cause d'erreur. De toute façon, lorsque cela s'est avéré nécessaire pour préciser les résultats, nous avons procédé à un dosage du maltose après séparation chromatographique, seule méthode véritablement spécifique à notre connaissance.

Le mode opératoire mis au point pour le blocage de l'activité bêta amylasique et l'extraction du maltose est donc le suivant :

Peser une quantité de produit de l'ordre de 0,030 à 0,050 g. dans un petit tube à centrifuger jaugé à 10 ml. Ajouter environ 5 ml de solution éthanolique à 80 p. 100 amenée à une température voisine de 70°C ; porter rapidement à l'ébullition, au bain-marie, pendant 30 secondes environ en agitant. Laisser refroidir, puis amener à 10 ml au moyen de cette même solution d'alcool. Désagréger à froid le coagulum, si

nécessaire, et laisser reposer pendant environ 1 heure. Centrifuger à 8 000 t/mn, puis filtrer sur verre fritté G4 pour retenir les particules éventuellement entraînées au cours de la décantation, en opérant sous une légère pression afin d'éviter l'évaporation.

b) *Cas des mélanges amidon-alpha amylase.*

L'alpha amylase utilisée est extrêmement stable à température élevée : maintenue à 100°C pendant quelques minutes en présence de son substrat, elle n'est que partiellement inhibée ; portée à l'ébullition dans une solution d'alcool à 80 p. 100, elle conserve encore une certaine activité si l'on revient en milieu aqueux ; aucun des ions organiques ou minéraux signalés dans la littérature comme inhibiteurs ne s'est montré capable de la bloquer complètement. Par contre, il suffit d'amener et de maintenir le milieu à pH 3 pour inactiver rapidement cet enzyme.

C'est pourquoi nous avons utilisé une solution d'alcool à 80 p. 100 contenant 1,5 p. 100 d'acide acétique pour bloquer l'action alpha amylasique et extraire les produits de dégradation de l'amidon d'une longueur de chaîne inférieure à 10 unités glucose. Ceci permet, en éliminant les dextrines de poids moléculaire élevé, de définir la fraction dosée des produits de dégradation et d'améliorer les séparations chromatographiques des constituants.

On opère de la façon suivante : les prises d'essai de 0,150 g. sont placés dans de petits tubes à centrifuger puis additionnées de 5 ml d'alcool acétique. Le produit est mis en suspension à l'aide d'un agitateur, centrifugé, éventuellement filtré sur G4 et le filtrat utilisé, soit pour le dosage des sucres extraits, soit pour la chromatographie après concentration.

2° *Concentration des liquides d'extraction.*

En vue de concentrer rapidement les extraits aqueux pour effectuer dans les meilleures conditions la séparation par chromatographie des produits de dégradation, nous avons réalisé un dispositif adaptable aux dessiccateurs courants.

Le système préconisé consiste en une gouttière à anhydride phosphorique ayant la forme d'un entonnoir à angle très ouvert, pouvant être réalisée à l'aide de matériaux tels que le verre, le chlorure de polyvinyle ou à la rigueur l'aluminium et supportée par un cristallisoir (fig. 8). Il présente les avantages suivants :

— La surface déshydratante est constamment renouvelée et l'acide formé s'écoule par l'orifice central dans le cristallisoir ; ainsi, il ne se produit pas de croûte superficielle d'acide phosphorique qui empêche la déshydratation de se poursuivre.

— La charge maximum en P_2O_5, pouvant être utilisée dans le modèle correspondant au croquis, atteint 170 g. et permet la fixation de 100 ml d'eau en quelques heures, en opérant à la température ordinaire sous un vide de 20 à 30 mm de Hg. Dans ces conditions, même lorsque la solution est placée dans des tubes à essai de faible section, l'évaporation est encore active.

En raison de la réaction fortement exothermique de l'eau sur l'anhydride phosphorique, il est nécessaire de placer le dessiccateur au voisinage de 0°C et de ménager un espace entre le support et les récipients où se trouvent les liquides pour éviter l'ébullition sous vide et les projections éventuelles.

Dans le cas des solutions alcooliques, la concentration peut être effectuée en présence de silicagel contenu dans un sachet en toile de nylon à mailles très ouvertes.

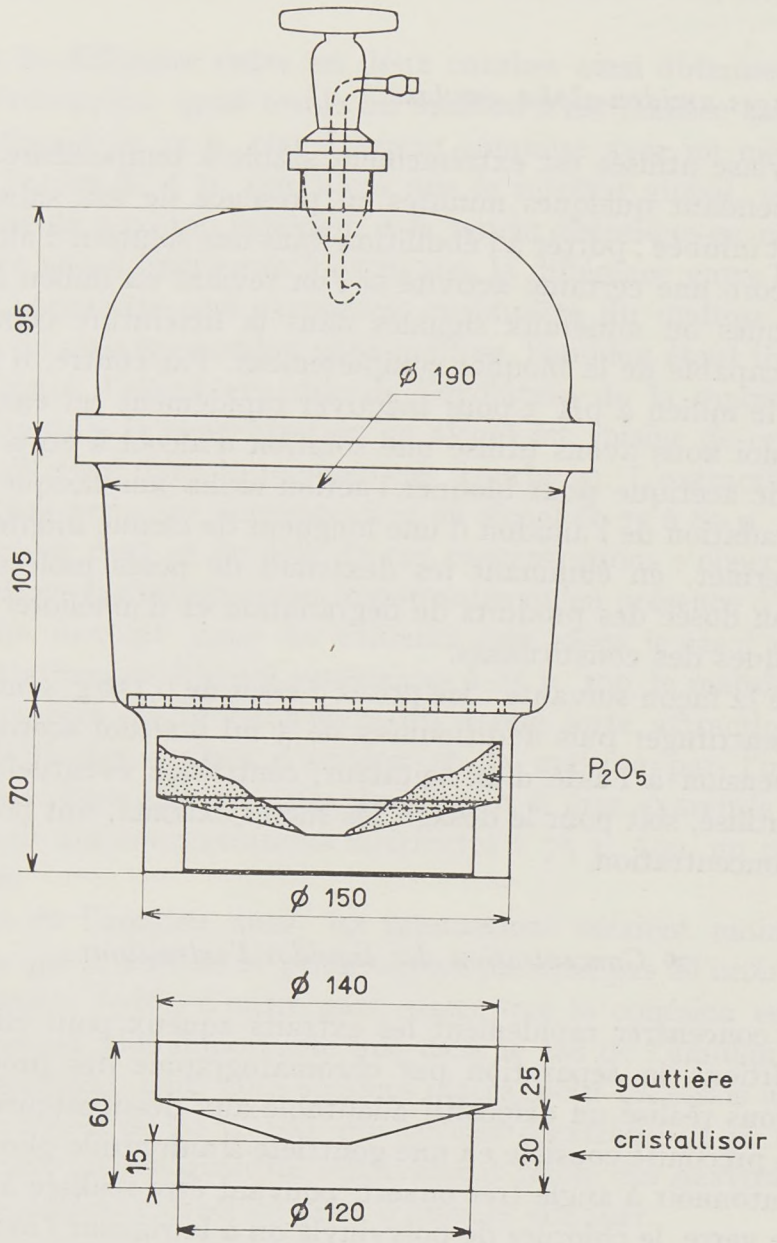


FIG. 8. — *Dessiccateur pour concentrations.*

3° *Identification des produits de la réaction par chromatographie sur papier.*

a) *Préparation et développement des chromatogrammes.*

La séparation des glucides libérés par l'hydrolyse enzymatique et extraits, soit par l'alcool, soit par l'eau en présence d'ions Ag^+ a été effectuée au moyen de la chromatographie de partage sur papier, réalisée par écoulement descendant continu de la phase mobile, selon la technique de ISHERWOOD et JERMYN (1951), en utilisant comme solvant :

— soit le mélange biphasique : butanol n. -acide acétique-eau (4-1-5) mis au point par PARTRIDGE (1948) ;

— soit le mélange monophasique : butanol n. -pyridine-eau (1-1-1) préconisé par CHARGAFF et *al.* (1948) pour la séparation des oligoholosides et dont les avantages sont précisés par DEDONDER (1960).

Au cours de ce travail, nous avons été amenés à mettre au point un dispositif permettant, d'une part, de provoquer rapidement la saturation du papier avec les vapeurs du solvant ; d'autre part, de réaliser à température constante un état d'équilibre permanent entre les constituants du système. Ce dispositif consiste en un ventilateur adapté sur des cuves cylindriques, en verre, de 60 cm de hauteur et de 20 cm de diamètre, permettant une homogénéisation rapide de l'atmosphère de la cuve.

Les résultats obtenus montrent que le temps nécessaire pour la saturation du papier est réduit à une heure environ. Il est même possible de commencer le développement sans équilibrage préalable, le temps mis par le solvant pour parcourir la feuille jusqu'à la ligne de départ étant généralement suffisant pour que cet équilibre se réalise au cours de l'opération.

L'utilisation d'un tel montage nous a conduit en outre à mettre au point une nouvelle technique de chromatographie sur papier faisant intervenir, au cours du développement, les forces d'évaporation créés par l'établissement d'un gradient de température à l'intérieur de la cuve, forces qui viennent s'ajouter à celles dues à la capillarité et à la gravité.

Les résultats obtenus avec cette méthode montrent qu'il est ainsi possible d'obtenir les avantages suivants :

— Une meilleure résolution des « spots » : ceux-ci sont peu diffus et par conséquent mieux séparés. Il en résulte une meilleure précision des enregistrements d'extinctions par photométrie directe.

— Une excellente reproductibilité des Rf relatifs, ce qui permet une meilleure localisation des « spots », en vue d'une élution quantitative, après révélation de deux bandes témoins encadrant celles utilisées pour le dosage.

— Enfin il est possible, dans la séparation des composés glucidiques en particulier, d'obtenir, sur un même chromatogramme et convenablement séparés, les oses et les oligoholosides dont le degré de polymérisation peut atteindre plus de 14 unités glucose en chaîne droite. La durée d'opération est alors nettement plus courte qu'avec la méthode des développements multiples préconisée par JEANES et *al.* (1951).

Cette technique a fait l'objet récemment d'une communication (DRAPRON, 1961 *a*). Des recherches se poursuivent actuellement pour en préciser certains aspects théoriques et pratiques.

Toutes les séparations chromatographiques effectuées au cours de ce travail ont été réalisées en utilisant cette technique.

La séparation de colorants tels que le carmin d'indigo, le jaune naphtol S, la phénol-sulfone-phtaléine dont les valeurs de Rf sont très différentes, permet de suivre les séparations au cours du développement et par suite de régler le gradient de température en fonction du solvant utilisé.

Le mode de préparation des chromatogrammes est le suivant :

Des bandes 18 × 57 cm sont découpées dans une feuille de papier WHATMAN n° 1 de façon que l'écoulement du solvant s'effectue parallèlement aux fibres du papier. La ligne de départ est tracée à 11 cm du bord supérieur et la partie inférieure découpée en dents de scie pour faciliter l'égouttage lors du développement.

Les marqueurs et les extraits sont déposés, selon leur concentration, sous forme de taches ponctuelles ou de traînées horizontales de 1 cm, distantes de 3 cm les unes des autres, puis séchés sous courant d'air chaud. La feuille de papier est alors disposée dans la cuve, l'écoulement est poursuivi pendant une durée de 48 à 96 h selon les cas. Au bout de ce temps, le chromatogramme est séché à l'air puis imprégné d'un réactif destiné à la révélation des taches.

b) Révélation des chromatogrammes.

La révélation est effectuée, soit par pulvérisation de réactifs appropriés, soit, lorsque les solutions de réactif sont faites dans un liquide dans lequel les sucres sont insolubles, par immersion dans un bain de réactif selon les indications de HARRIS et Mc WILLIAM (1954), Mc CREADY et Mc COMB (1954). Cette dernière technique a l'avantage d'éviter la diffusion des taches et comme l'a fait remarquer DEDONDER (1960), elle est tout spécialement recommandée pour l'utilisation de réactifs à action cancérigène certaine comme la benzidine (SCOTT, 1953).

α) La révélation par pulvérisation a été effectuée, par le phtalate d'aniline (PARTRIDGE, 1949) ou par le nitrate d'argent ammoniacal (PARTRIDGE, 1948).

La composition des réactifs et les conditions de révélation sont les suivantes :

— phtalate d'aniline : aniline 0,93 g, acide phtalique 1,66 g, butanol n. saturé d'eau, q. s. p. 100 ml ;

Après pulvérisation, le chromatogramme est porté pendant 5 minutes à 105°C. La réaction est d'une très grande sensibilité par examen en lumière ultra-violette (CRAMER, 1953) ;

— nitrate d'argent ammoniacal : 1 volume NO_3 Ag 0,1 N + 1 volume NH_4 OH 5 N. Après pulvérisation, le chromatogramme est porté 5 à 10 minutes à 105°C. Ce réactif n'est pas sélectif et il est influencé par les impuretés du papier ou des solvants. Sa sensibilité est très grande vis-à-vis des sucres réducteurs.

β) La révélation par immersion a été faite, soit par oxydation périodique (CIFONELLI et SMITH, 1954), soit au moyen de réactifs utilisant la formation de combinaisons entre les dérivés furfuriques et les amines :

— réactif au métapériodiate : 1 ml de solution de Na IO_4 0,1 M (0,228 g. pour 10 ml H_2O) + 19 ml d'acétone.

Le chromatogramme est imprégné par immersion puis séché à l'air pendant 5 minutes. Il est ensuite immergé dans une solution de benzidine de composition suivante :

0,184 g. de benzidine dans 95 ml d'acétone + CH_3COOH 0,6 ml + H_2O 4 ml (GORDON, THORNBURG et WERUM, 1956).

Après séchage à la température ordinaire, les substances oxydées par le périodate sont localisées par l'apparition de taches blanches ou jaunes sur le fond bleu produit par l'oxydation de la benzidine. La réaction n'est pas spécifique des oses.

— Réactif au trichloracétate de benzidine.

Nous avons utilisé le réactif de HORROCKS (1949), BACON et EDELMAN (1951), en remplaçant l'éthanol par de l'acétone ; la composition de la solution est la suivante : benzidine 0,5 g. acide trichloracétique 4 g. acide acétique 10 ml, acétone q. s. p. 100 ml.

Ce révélateur utilisable pour tous les sucres réducteurs donne une réaction. brune dont la sensibilité de détection est accrue par examen en lumière ultra-violette.

— Réactif au phosphate d'aniline et de diphénylamine.

Le réactif préconisé par GIRI et NIGAM (1953) est préparé comme suit : aniline 2 ml, diphénylamine 2 g. acide phosphorique à 85 p. 100 10 ml, acétone q. s. p. 100 ml.

Il permet de révéler tous les sucres réducteurs : il donne une coloration bleue avec les aldohexoses, sauf le glucose pour lequel la coloration est brun vert ; d'après les auteurs, il serait susceptible de différencier les holosides réducteurs, en donnant une coloration bleue dans le cas de liaisons alpha 1-4 et brune dans le cas de laisons alpha 1-6.

Ces deux derniers modes de révélation nécessitent que le chromatogramme, imprégné de réactif, soit placé pendant 5 minutes dans une étuve à température constante et convenablement ventilée, munie d'un voyant en verre permettant de suivre l'évolution des colorations au cours de la révélation.

La température est réglée à 95°C dans le cas du réactif de HORROCKS et à 80°C dans le cas du réactif de GIRI.

Après révélation, les chromatogrammes peuvent être photographiés ; tous ceux présentés dans ce travail sont les duplicatas des originaux, obtenus par reproduction héliographique sur papier « diazo ». Cette méthode de reproduction, qui à notre connaisance n'a jamais été signalée, constitue un procédé rapide et économique permettant de conserver ces documents indéfiniment sans altération (DRAPRON, 1961 *a*).

c) *Technique mise au point en vue du dosage ultérieur des produits séparés.*

Dans certaines expériences, nous avons été amenés à doser le maltose séparé par chromatographie sur papier.

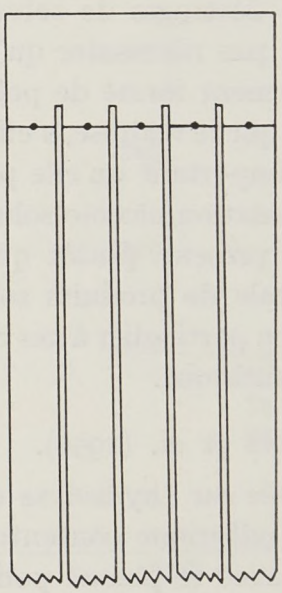


FIG. 9. — *Préparation d'un chromatogramme en vue d'une élution quantitative.*

La chromatographie sur papier avec gradient d'évaporation de la phase mobile permet la localisation exacte des taches de maltose dans le sens horizontal en raison de la parfaite reproductibilité des Rf relatifs ; cependant, la direction de migration s'écarte toujours de la verticale. Dans le but de localiser exactement les taches, on découpe, après avoir déposé les extraits, des bandes verticales de 2 mm entre chaque dépôt, de façon à isoler chaque parcours.

L'expérience montre que le déplacement des substances est ainsi parfaitement régulier et qu'il est ensuite facile de les localiser avec précision.

Le maltose est repéré par révélation de deux bandes témoins encadrant celles utilisées pour le dosage (fig. 9).

Élution : La partie du papier contenant le maltose est découpée sous forme d'une languette taillée en pointe à une extrémité.

Elle est fixée, par l'autre extrémité, sur une bande de papier maintenue verticalement et alimentée en eau par capillarité, le papier est alors parcouru comme pour une chromatographie descendante dans une atmosphère saturé d'eau. On recueille ainsi, par élution, 2 à 3 ml de solution dans un tube jaugé placé sous la pointe de la languette de papier.

On effectue deux essais à blanc dans les mêmes conditions, en découpant des morceaux de papier de surfaces identiques dans une partie de la feuille du chromatogramme située en dessous du maltose. Ce mode d'élution n'entraîne aucune fibre de cellulose qui pourrait perturber le dosage.

4° *Techniques de dosage des glucides*

En raison, d'une part, de la faible importance des prises d'essai du mélange enzyme-substrat qu'il convient de mettre en œuvre pour obtenir une hydratation homogène ; d'autre part, des petites quantités de produits de dégradation qui peuvent se former, il s'est avéré nécessaire d'utiliser une méthode de dosage suffisamment sensible et précise. Cette méthode doit permettre en outre d'effectuer des déterminations directement dans les extraits éthanoliques ou après chromatographie sur papier en présence de traces de solvants tels que l'acide acétique, le butanol et la pyridine. Il n'est pas nécessaire qu'elle soit spécifique d'un type de sucre, le milieu étant essentiellement formé de polymères de glucose et les dosages d'un oligoholoside déterminé tel que le maltose, s'effectuant après séparation chromatographique. Par contre, il est important qu'elle puisse fournir, surtout dans le cas du dosage des produits de dégradation alcoolo-solubles formés par action de l'alpha amylase, la totalité du glucose présent, plutôt que le pouvoir réducteur qui peut varier sans que la quantité totale de produits solubles soit modifiée.

Deux méthodes répondent en particulier à ces conditions : la méthode au phénol, de Dubois et la méthode à l'anthrone.

a) *Méthode au phénol, de* Dubois et *al.* (1956).

α) *Principe.* — Elle est basée sur l'hydrolyse éventuelle du glucide et la déshydratations des oses par l'acide sulfurique concentré. Les dérivés furfuriques formés se condensent immédiatement avec le phénol pour donner un produit coloré dont on mesure la densité optique. Dans le cas des hexoses et de leurs polymères, on obtient une coloration jaune orangée qui présente un maximum d'absorption à 492 mμ et suit la loi de Beer pour des concentrations en sucre dans la prise d'essai allant jusqu'à 70 γ.

β) *Examen critique.* — Divers auteurs (Matsuo et Namba, 1956) ; (Staron et *al.*, 1961), ont apporté plusieurs modifications aux conditions initialement décrites par Dubois ; nous avons de notre côté été amenés à préciser, pour en améliorer encore la reproductibilité, les modalités suivantes d'utilisation de cette technique :

— L'acide sulfurique pour toxicologie de PROLABO ne donne pas de résultats constants et dans certains cas, on obtient une coloration violette au lieu de la coloration jaune orangée ; l'acide sulfurique MERCK à 95-97 p. 100 ou l'acide sulfurique de PROLABO purifié par distillation, donnent par contre toute satisfaction.

— L'échauffement du milieu permettant la formation de dérivés furfuriques est obtenu par la réaction exothermique de l'acide sulfurique sur l'eau. Dans ces

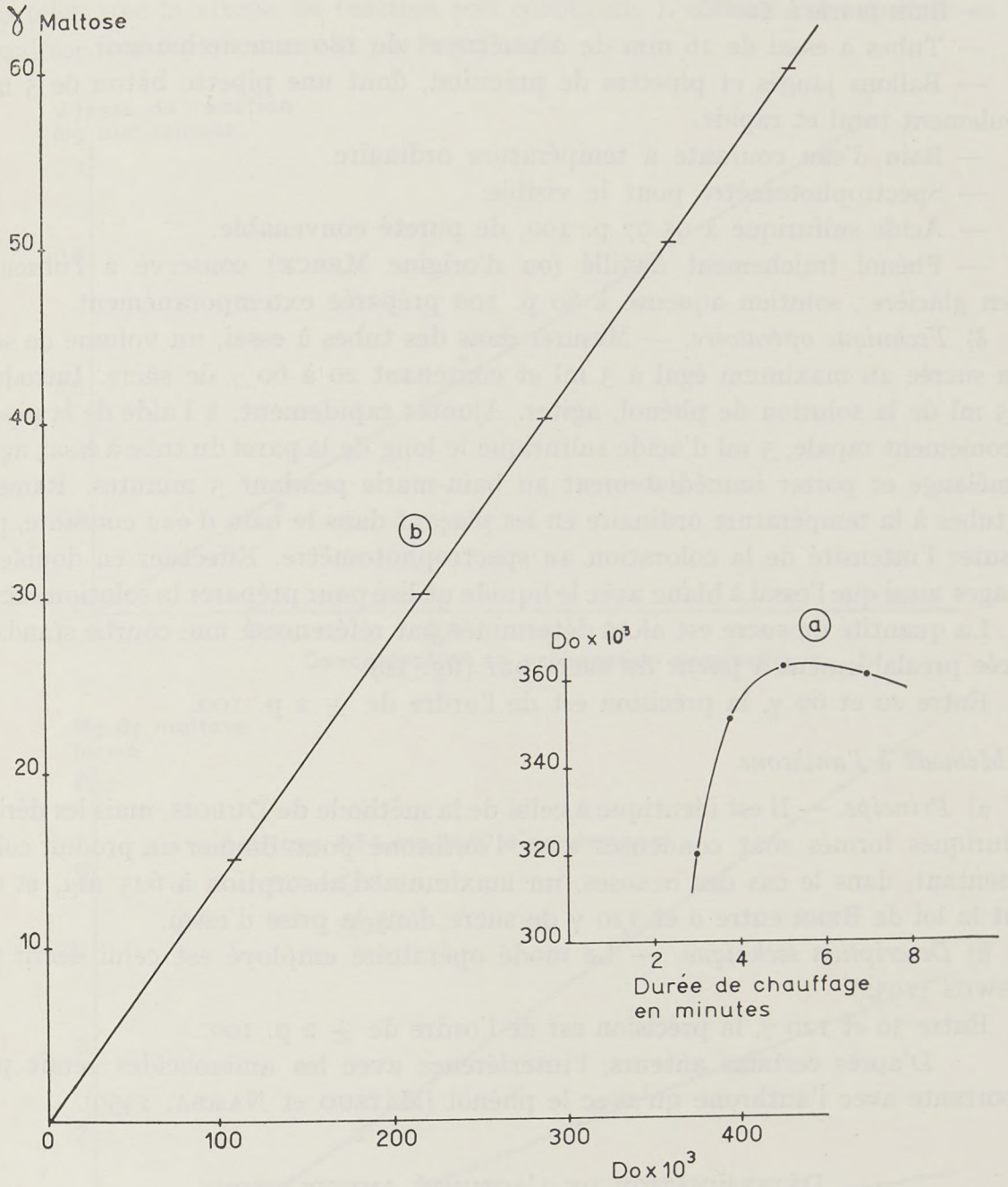


FIG. 10. — *Dosage du maltose par la méthode au phénol.*
(*a*) Rendement de la réaction.
(*b*) Courbe d'étalonnage.

conditions, la formation des composés furfuriques risque d'être plus ou moins complète selon la vitesse d'écoulement de l'acide sulfurique et le diamètre des tubes à essais, facteurs intervenant sur la rapidité de mélange des réactifs. C'est pourquoi nous avons étudié le rendement optimum de la réaction en fonction de la température

et du temps de chauffage. Les meilleures conditions sont réalisées lorsque le mélange réactionnel est porté pendant 5 minutes au bain-marie à 100°C, temps au bout duquel l'absorption passe par un maximum (fig. 10).

Ces caractéristiques ont du reste été également précisées, depuis ce travail, par d'autres auteurs dans le cas du dosage du xylose (MATSUO et NAMBA, 1958).

γ) *Matériel et réactifs.*

— Bain-marie à 100°C.

— Tubes à essai de 16 mm de diamètre et de 180 mm de hauteur.

— Ballons jaugés et pipettes de précision, dont une pipette bâton de 5 ml à écoulement total et rapide.

— Bain d'eau courante à température ordinaire.

— Spectrophotomètre pour le visible.

— Acide sulfurique à 95-97 p. 100, de pureté convenable.

— Phénol fraîchement distillé (ou d'origine MERCK) conservé à l'obscurité et en glacière ; solution aqueuse à 80 p. 100 préparée extemporanément.

δ) *Technique opératoire.* — Mesurer dans des tubes à essai, un volume de solution sucrée au maximum égal à 3 ml et contenant 20 à 60 γ de sucre. Introduire 0,05 ml de la solution de phénol, agiter. Ajouter rapidement, à l'aide de la pipette à écoulement rapide, 5 ml d'acide sulfurique le long de la paroi du tube à essai, agiter le mélange et porter immédiatement au bain-marie pendant 5 minutes. Ramener les tubes à la température ordinaire en les plaçant dans le bain d'eau courante, puis mesurer l'intensité de la coloration au spectrophotomètre. Effectuer en double les dosages ainsi que l'essai à blanc avec le liquide utilisé pour préparer la solution sucrée.

La quantité de sucre est alors déterminée par référence à une courbe standard, tracée préalablement à partir du sucre pur (fig. 10).

Entre 20 et 60 γ, la précision est de l'ordre de ± 2 p. 100.

b) *Méthode à l'anthrone.*

α) *Principe.* — Il est identique à celui de la méthode de DUBOIS, mais les dérivés furfuriques formés sont condensés avec l'anthrone pour donner un produit coloré présentant, dans le cas des hexoses, un maximum d'absorption à 625 mμ, et suivant la loi de BEER entre 0 et 120 γ de sucre dans la prise d'essai.

β) *Description technique.* — Le mode opératoire employé est celui décrit par LOEWUS (1952).

Entre 30 et 120 γ, la précision est de l'ordre de ± 2 p. 100.

D'après certains auteurs, l'interférence avec les aminoacides serait plus importante avec l'anthrone qu'avec le phénol (MATSUO et NAMBA, 1959).

DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ AMYLOLYTIQUE

Au cours de ce travail, la détermination de l'action des amylases, en fonction du temps et de l'humidité relative, a été effectuée en dosant les produits de dégradation formés dans les conditions que nous venons d'exposer.

Par ailleurs nous avons procédé, dans le cas de la bêta amylase, à des déterminations d'activité « intrinsèque » pour savoir si elle n'avait pas été plus ou moins détruite au cours des différentes opérations.

En ce qui concerne l'alpha amylase, ces déterminations n'ont pas été effectuées, l'étude étant restée surtout qualitative ; nous avons seulement vérifié qu'une grande partie de l'activité était conservée.

Mesure de l'activité « intrinsèque » de la beta amylase

α) *Principe.* — On détermine les quantités de maltose formées dans des conditions telles que la vitesse de réaction soit constante. L'activité est exprimée en mg de maltose formé par minute et par mg d'azote.

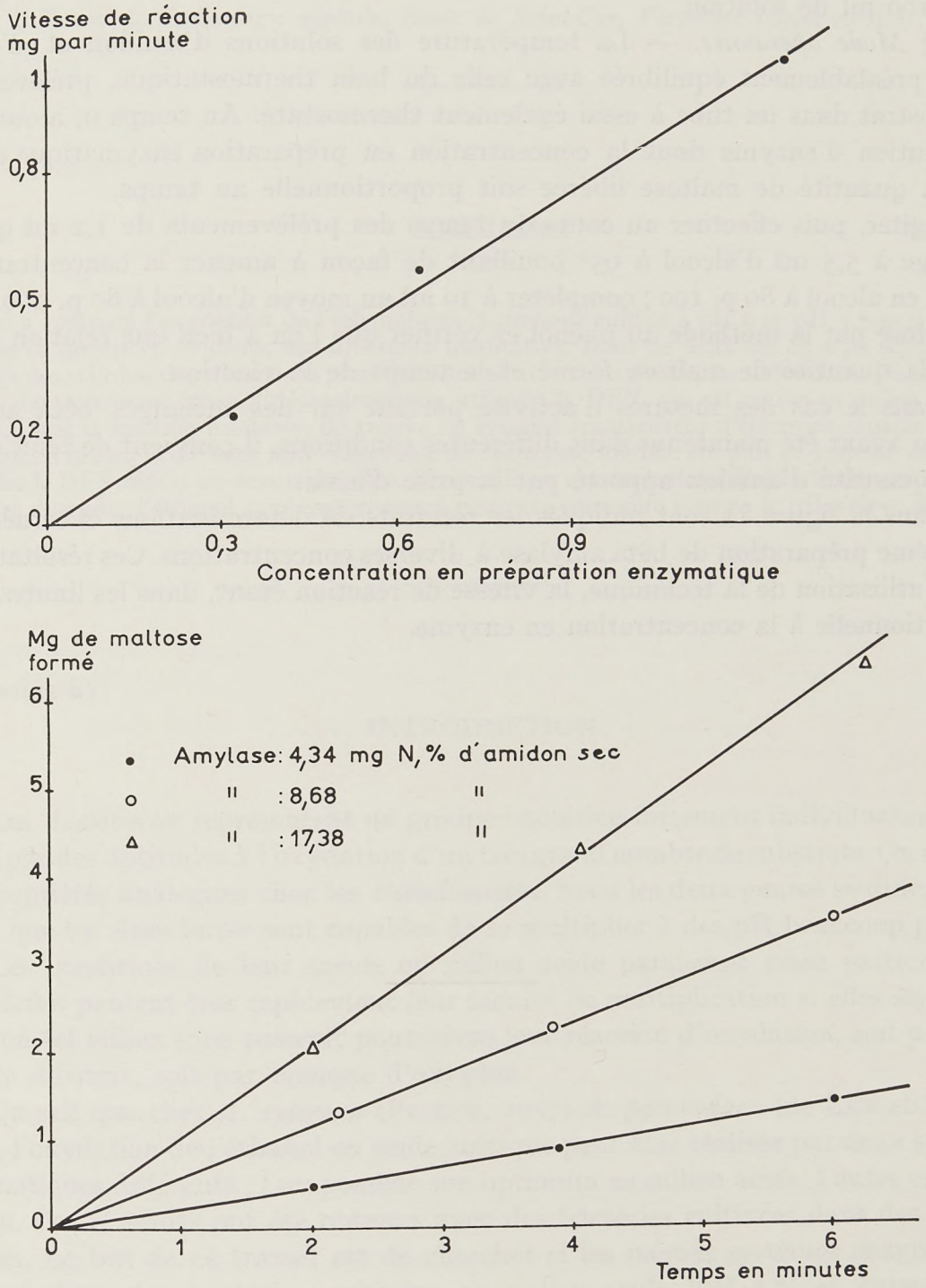


Fig. 11. — *Action bêta amylasique en fonction de la concentration en préparation enzymatique d'activité* 143 (*exprimée en mg de maltose formé par minute et par mg d'azote*).

β) *Matériel et réactifs.*

— Bain thermostatique.
— Chronomètre.
— Tubes à essai.
— Tubes de centrifugeuse jaugés à 10 ml.
— Centrifugeuse tournant à 8 000 t/m.
— Filtre en verre fritté G4.
— Solution à 4 p. 100 d'amidon MERCK préparée suivant le mode opératoire décrit précédemment et tamponnée à pH 4,8 par addition de 5 ml de tampon acétate pour 100 ml de solution.

γ) *Mode opératoire.* — La température des solutions d'amidon et d'enzyme étant préalablement équilibrée avec celle du bain thermostatique, prélever 5 ml de substrat dans un tube à essai également thermostaté. Au temps 0, ajouter 1 ml de solution d'enzyme dont la concentration en préparation enzymatique est telle que la quantité de maltose libérée soit proportionnelle au temps.

Agiter, puis effectuer au cours du temps des prélèvements de 1,2 ml que l'on mélange à 5,5 ml d'alcool à 95° bouillant de façon à amener la concentration du milieu en alcool à 80 p. 100 ; compléter à 10 ml au moyen d'alcool à 80 p. 100. Doser le maltose par la méthode au phénol et vérifier que l'on a bien une relation linéaire entre la quantité de maltose formé et le temps de la réaction.

Dans le cas des mesures d'activité portant sur des mélanges bêta amylase-amidon ayant été maintenus dans différentes conditions, il convient de tenir compte de la quantité d'amidon apporté par la prise d'essai.

Dans la figure 11 sont indiqués les résultats de déterminations effectuées avec une même préparation de bêta amylase à diverses concentrations. Ces résultats justifient l'utilisation de la technique, la vitesse de réaction étant, dans les limites fixées, proportionnelle à la concentration en enzyme.

(à suivre)

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (3), 219-225.

OXYDATION DE L'ÉTHANOL PAR ACETOBACTER RANCENS

P. DUPUY et J. MAUGENET

Station de Technologie végétale, Route de Saint-Cyr, Versailles (Seine-et-Oise).

SOMMAIRE

On a comparé l'oxydation de l'éthanol par *A. rancens* cultivé à pH 6 et pH 3,8 sans qu'il soit possible de mettre en évidence une différence qualitative. Dans les deux cas on a pu séparer, après broyage des cellules, deux fractions possédant des activités enzymatiques différentes. Dans la partie soluble, on trouve une éthanol déshydrogénase utilisant le DPN, qui est active en milieu neutre et alcalin. Dans la fraction insoluble, on trouve un système transporteur d'électrons capable d'oxyder l'éthanol en milieu acide sans faire intervenir de coenzyme soluble. De plus ce système est capable d'oxyder le DPN réduit au-dessus de pH 6. Ceci explique que les cellules d'*Acetobacter rancens* soient capables d'oxyder l'éthanol avec une vitesse à peu près constante lorsque le pH s'élève de 3,8 à 8.

INTRODUCTION

Les *Acetobacter* représentent un groupe bactérien fortement individualisé, caractérisé par des aptitudes à l'oxydation d'un très grand nombre de substrats. On retrouve des propriétés analogues chez les *Pseudomonas*, mais les deux genres se différencient parce que les *Acetobacter* sont capables de se multiplier à des pH beaucoup plus bas.

Les conditions de leur survie en milieu acide paraissent assez particulières : les cellules perdent très rapidement leur faculté de multiplication si elles séjournent dans un tel milieu sans pouvoir poursuivre leur réaction d'oxydation, soit par manque de substrat, soit par manque d'oxygène.

On sait que chez *A. xylinum* (Prieur, 1957) *A. peroxydans* (de Ley et Schell, 1959), l'oxydation de l'éthanol en acide acétique peut être réalisée par deux systèmes enzymatiques différents : l'un possède son optimum en milieu acide, l'autre en milieu alcalin. Ces résultats ont été obtenus avec des bactéries cultivées dans des milieux neutres. Le but de ce travail est de chercher si les mêmes systèmes enzymatiques existent dans des bactéries cultivées en milieu acide (pH 3,8) et autour de la neutralité (pH 6).

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Les bactéries sont cultivées à 25° dans le milieu suivant :

Extrait de levure Difco	3 g
Extrait de viande Difco	3 g
Solution minérale B de Skeggs et Wright	5 ml
$PO_4 H_2K$	2 g
Glucose	20 g
Eau	1 litre

Ajusté au pH désiré par $PO_4 H_3$ concentré.

La culture s'effectue dans une colonne dont la partie inférieure est fermée par une plaque en verre fritté de porosité 3. De l'air comprimé forcé à travers cette plaque permet de fournir l'oxygène nécessaire et d'homogénéiser la culture. Le pH est maintenu constant au cours de la culture grâce à l'addition de NaOH 5N, réglée avec un pH stat.

Deux pH de culture ont été adoptés dans ce travail : pH 3,8 et pH 6 ce dernier étant le pH optimum de croissance de cette souche.

Les bactéries récoltées avant l'épuisement du substrat sont lavées 2 fois dans l'eau distillée et conservées dans l'eau à + 2°. Avec *Acetobacter* la plasmolyse est négligeable.

Les mesures de respiration ont été faites dans l'appareil de Warburg, à 30°, par la méthode directe et en présence de 10 µ moles de substrat sauf indication contraire.

La préparation d'extrait dépourvu de cellules se fait en broyant manuellement dans un mortier les bactéries mélangées à de la poudre de verre pyrex passant au tamis 150. Le broyage est effectué à une température voisine de 0° pendant 10 minutes. La pâte correspondant à 12 g de bactéries, en poids frais, est reprise dans 50 ml d'eau, centrifugée une première fois 30 minutes à 8 000 g pour éliminer les débris et la poudre de verre.

L'extrait est ensuite soumis à une centrifugation de 30 000 g pendant 2 heures. On sépare ainsi une partie claire dénommée par la suite extrait et un précipité que l'on lave à l'eau et recentrifuge ; cette fraction est désignée dans le texte sous le nom de granules.

On a utilisé les tampons suivants :

Tris-HCl, 0,2 M (MICHAELIS),

Phosphate Na-K, 0,2 M (SÖRENSEN),

Tris-acide tartrique, 0,2 M.

Ce dernier tampon permet d'obtenir les pH compris de 3 à 5. L'utilisation d'une base organique évite la précipitation de bitartrate alcalin. On a vérifié que l'acide tartrique n'est pas oxydé par les cellules non proliférantes d'*Acetobacter*.

L'azote total a été déterminé par la technique de LUBOCHINSKY et ZALTA (1954).

RÉSULTATS

1° *Oxydation de l'éthanol par les cellules* (tableau 1)

On a déterminé l'absorption d'oxygène grace à l'appareil de Warburg pour les bactéries non proliférantes placées en présence d'éthanol à divers pH. La courbe d'activité suivant le pH n'a pas l'allure symétrique que l'on rencontre habituellement pour les enzymes isolés. Quel que soit le pH de culture des bactéries, le pH optimum de l'oxydation de l'éthanol est compris entre pH 5 et pH 6. L'activité se maintient voisin de cette valeur jusqu'à pH 8. Les bactéries cultivées à pH 6 ont une intensité respiratoire deux fois plus élevée que celles récoltées à pH 3,8. Ces dernières apparaissent d'ailleurs beaucoup moins aptes à oxyder l'éthanol en milieu acide que celles cultivées à pH 6.

TABLEAU I

Vitesse d'oxydation de l'éthanol par A. rancens *cultivé à des* pH *différents*

	pH des mesures						
	3,0	3,8	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
Bactéries provenant de cultures à pH 3,8	27	41	144	158	136		126
Bactéries provenant de cultures à pH 6,0	236	286	300	293	270	285	

Tampon 0,1 M. Résultats exprimés en µl O_2 par heure à 30° pour 1 mg de poids sec.

2° *Oxydation de l'éthanol par les granules* (tableau 2)

Les granules oxydent aussi l'éthanol à un pH optimum de 5-6. La courbe des activités en fonction du pH a une allure symétrique bien différente de celle observée pour les bactéries entières. Les bactéries cultivées à pH 3,8 donnent des granules très peu actifs mais ils ne paraissent pas avoir des propriétés enzymatiques différentes de ceux provenant des bactéries récoltées à pH 6.

TABLEAU 2

*Oxydation de l'éthanol par les granules d'*A. rancens *cultivés à deux* pH *différents*

	pH des mesures					
	3	3,8	5	6	7	8
(1) Granules provenant de culture à pH 6	100	1 600	2 980	2 300	560	100
(2) Granules provenant de culture à pH 3,8		135	195	240	44	

Résultats exprimés en µl O_2 par heure par mg de N à 30°
Tampon 0,1 M volume total 2 ml
(1) granules correspondant à 0,13 mg N par fiole ;
(2) granules correspondant à 0,47 mg N paf fiole.

3° *Oxydation du* DPN *réduit par les granules* (tableau 3)

On a pu mettre en évidence par mesure manométrique dans l'appareil de Warburg l'oxydation du DPN réduit. Le tableau donne l'activité comparée des mêmes granules sur l'éthanol et sur le DPN réduit.

TABLEAU 3

*Oxydation comparée de l'éthanol et du DPN réduit par les granules d'*A. rancens

pH de la mesure	Éthanol	DPN réduit
8	100	1 410
6	2 300	1 970
3,8	1 600	256

(1) Résultats exprimés en µl O_2 absorbé par mg de N et par heure à 30°. Dans chaque fiole tampon 0,1 M 6,2 mg de DPN H_2 à 75% de pureté Granules provenant de bactéries cultivées à pH 6.

4° *Éthanol* — DPN *déshydrogénase dans l'extrait* (tableau 4)

Cette enzyme assez semblable à celle de la levure a été découverte chez *Acetobacter* par KING et CHELDELIN (1954). L'extrait mis en présence de substrat ne présente aucune modification décelable de son spectre autour de 340 mµ, ce qui semble indiquer que le DPN ne doit être présent dans l'extrait qu'à faible concentration. La réduction du DPN a été suivie à pH 6-7-8 et 9.

Avec les deux extraits, le pH optimum de la réaction est voisin de 9. Il est donc légèrement supérieur à celui déterminé par PRIEUR. Les courbes d'activité de l'extrait suivant le pH sont les mêmes, qu'il provienne des bactéries cultivées à pH 3,8 ou à pH 6.

L'activité spécifique est supérieure dans l'extrait provenant des bactéries cultivées à pH 3,8 parce qu'on a solubilisé moins de protéine au cours de l'extraction. L'activité totale rapportée à la masse de bactéries soumises à l'extraction est voisine dans les deux cas.

On a vérifié que les granules placés en anaérobiose ne sont pas capables de réduire le DPN.

TABLEAU 4

*Activité Éthanol–DPN–déshydrogénase dans des extraits d'*A. rancens *cultivé à* pH 3,8 *et* pH 6

pH de la mesure	Culture pH 3,8 extrait contenant 0,37 mg/ml de N	Culture pH 6 extrait contenant 1,17 mg/ml de N
9	1,13	0,54
8	1,03	0,40
7	0,57	0,15
6	0,15	0,032

5° *Combinaison des granules et de l'extrait* (tableau 5)

Il est possible de coupler la réduction du DPN provoquée par l'extrait et sa réoxydation provoquée par les granules. A pH 6 où la déshydrogénase de l'éthanol est très peu active, le mélange des deux fractions n'augmente pas la vitesse d'absorp-

tion de l'oxygène. Au contraire à pH 8 la fixation de l'oxygène est fortement augmentée lorsqu'on mélange extrait, DPN et granules. Pour obtenir le couplage des deux activités l'addition de DPN est indispensable.

TABLEAU 5

Vitesse d'oxydation de l'éthanol par un mélange de granules et d'extrait

	Mesures à pH 6	Mesures à pH 8
Extrait	12	—
Extrait + DPN	12	16
Granules	164	—
Granules + DPN	164	15
Granules + extrait	165	13
Granules + extrait + DPN	163	89

Tampon 0,05 M, éthanol 4 µ mol, DPN 0,75 mg, extrait 0,7 mg de N, granules 0,13 mg de N pour un volume total de 2 ml. Préparation provenant de bactéries récoltées à pH 6. Résultats exprimés en µl O_2 à 30° par heure pour chaque fiole.

DISCUSSION

On retrouve dans *A. rancens* quel que soit le pH de son milieu de culture deux systèmes susceptibles de transformer l'éthanol en acétate. Sur ce point cette espèce ne diffère donc pas de *A. xylinum* et *A. peroxydans*. Les bactéries cultivées à pH 3,8 donnent des préparations ayant des activités plus faibles que celles obtenues avec les bactéries cultivées à pH 6. Il est assez vraisemblable que cette différence est due à une certaine difficulté pour solubiliser les protéines dans les bactéries provenant d'un milieu acide. En effet, on a constaté qu'avec les bactéries cultivées à pH 6 on extrait dans des conditions identiques trois fois plus d'azote total et six fois plus d'acides nucléiques. Dans la fraction granule on retrouve des quantités très voisines d'azote total 0,65 et 0,78 mg/ml. L'inactivation des granules qui se produit au cours du broyage est beaucoup plus forte pour les bactéries cultivées à pH 3,8.

L'étude de de Ley et Dochy (1960) a établi que les granules ne sont pas des unités anatomiques autonomes existant dans la bactérie. Il faut plutôt les considérer comme des fragments de membranes résultant du broyage des cellules. Les examens au microscope électronique, que nous avons faits sur nos préparations, montrent une grande hétérogénéité dans la taille des particules. On parvient donc à séparer dans les deux préparations extrait et granules des activités localisées dans des parties différentes de la cellules bactérienne.

Si l'on suppose que l'activité des préparations est proportionnelle à celle qui existe dans les bactéries, on peut établir les schémas suivants qui donnent une idée de l'importance relative des deux voies d'oxydation de l'éthanol à pH 8, 6 et 3,8.

Il est logique d'admettre que le pH intérieur des bactéries reste voisin de la neutralité même lorsque le milieu extérieur est acide. En effet, dans nos expériences on n'a jamais retrouvé d'accumulation d'acide acétique libre dans les *Acetobacter* cultivés à pH bas en présence d'éthanol. On constate qu'en milieu acide l'oxydation de l'éthanol se fait en grande partie grâce au système transporteur d'électrons situé dans la membrane. En milieu alcalin, le système transporteur d'électrons n'est plus actif sur l'éthanol mais il est encore actif sur le DPN réduit. L'oxydation se fait alors par l'intermédiaire de la déshydrogénase de l'éthanol. Ces deux voies d'oxydation mettent en jeu des enzymes constitutifs puisqu'on les rencontre dans des cellules cultivées en l'absence d'éthanol.

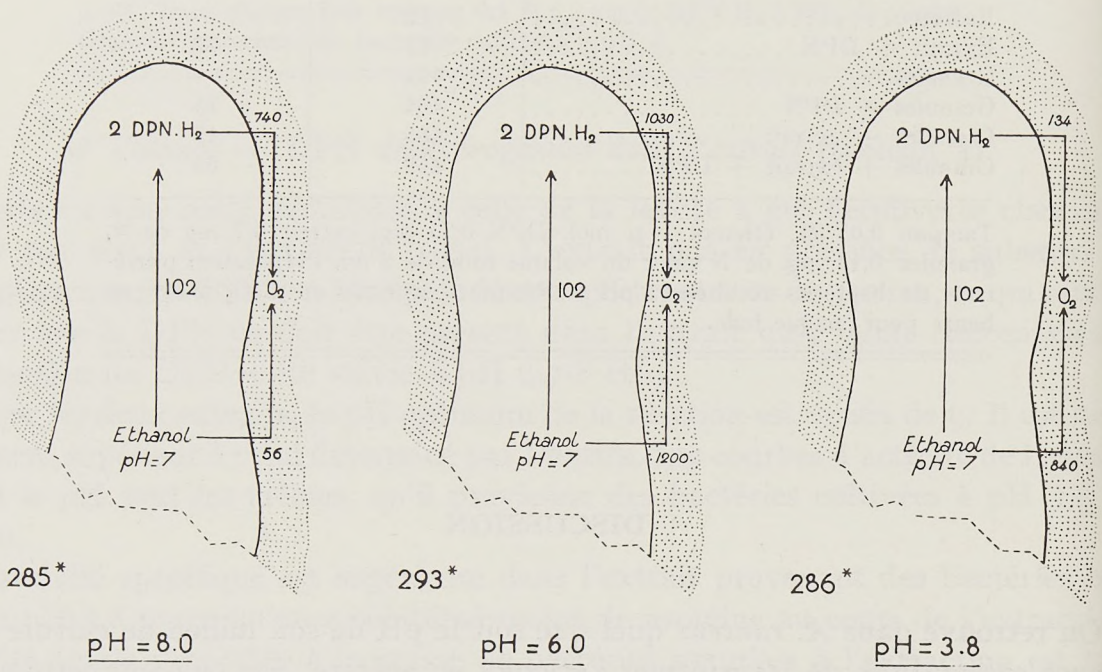


Schéma de l'oxydation de l'éthanol par A. RANCENS

* Vitesses d'oxydation de l'éthanol par les bactéries entières. (Vitesse exprimée en $\mu l\ O_2$ à 30°C par mg et par heure).

La voie d'oxydation de l'éthanol en acide acétique qui met en jeu les déshydrogénases solubles passe obligatoirement par le stade aldéhyde. NEUBERG et NORD (1910) sont d'ailleurs parvenus à accumuler ce produit en réalisant la fermentation acétique en présence de sulfite. Il serait intéressant de rechercher si le système transporteur d'électrons transforme l'éthanol en acide sans libérer de l'acétaldéhyde dans le milieu. On peut, en effet, penser que la molécule d'éthanol une fois fixée sur le site actif de la particule, ne sera libérée que lorsqu'elle aura été amenée au stade acide acétique.

CONCLUSION

A. rancens peut oxyder l'éthanol par l'intermédiaire d'une déshydrogénase soluble et du DPN. Cette voie paraît analogue à celle dévouverte dans la levure et dans le foie. Il possède aussi une autre voie qui fonctionne seulement en milieu acide

et qui met en jeu des particules transporteurs d'électrons sans qu'intervienne de coenzyme soluble. Ce système se retrouve chez trois espèces d'*Acetobacter* et il existe quel que soit le pH de culture.

Reçu pour publication en avril 1962.

SUMMARY

OXIDATION OF ETHANOL BY *Acetobacter rancens*

No qualitative difference was observed in the oxidation of ethanol by. *A rancens* whether cultivated at pH 6 or pH 3.8. In both cases, after crushing the cells, two fractions having different enzyme activities could be separated. In the soluble fraction an ethanol dehydrogenase making use of DPN was present and became active under neutral or alkaline conditions. An electron transport system was discovered in the insoluble fraction which was capable of oxidizing ethanol in an acid medium without having recourse to a soluble coenzyme. Furthermore this system was able to oxidize reduced DPN above pH 6. This explains why the cells of *Acetobacter rancens* can oxidize ethanol between the pH range of 3.8 to 8 at a more or less constant rate.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

KING T. E., CHELDELIN V. H., 1954. Oxidations in *Acetobacter suboxydans*. *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 108-116.

DE LEY J., SCHELL J., 1959. Studies on the metabolism of *Acetobacter peroxydans*. II The enzymic mechanism of lactate metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, **35**, 154-165.

DE LEY J., DOCHY R., 1960. Intermittent ultrasonic disruption and localisation of enzymes in acetic acid bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.*, **42**, 538.

LUBOCHINSKY B., ZALTA J. P., 1954. Microdosage colorimétrique de l'azote ammoniacal. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, 1363-1366.

NEUBERG C., NORD E., 1919. Anwendungen der Abfangsmethode auf die Bakteriengärungen. II Festlegung der Aldehydstufe bei der Essiggärung. *Biochem. Z*, **96**, 158.

PRIEUR P., 1957. Présence de deux systèmes d'oxydation de l'éthanol dans *Acetobacter xylinum*. *C. R. Acad. Sci.*, **244**, 253-255.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (3), 227-233.

SUR LA PRÉSENCE DE L'HYDROXYMÉTHYLFURFURAL DANS CERTAINS JUS DE RAISIN

M. FLANZY et Yvonne COLLON

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude).

SOMMAIRE

Les conclusions des auteurs qui se sont préoccupés de l'origine de l'hydroxyméthylfurfural des jus de fruits sont assez discordantes. Certains estiment en particulier que la présence de ce corps caractérise l'emploi de la technique de désulfitation.

Le présent travail reprend à son tour le problème.

Après avoir recherché et dosé ce constituant dans des jus de raisin de diverses origines, on établit que la technique de désulfitation conduite rationnellement n'est pas à l'origine de l'hydroxyméthylfurfural trouvé dans les jus de raisin fraîchement préparés.

INTRODUCTION

Connu et étudié depuis de nombreuses années, l'hydroxyméthylfurfural est considéré quelquefois comme responsable du goût de « cuit » de certains jus de fruits, et tenu pour preuve d'une préparation défectueuse de ces derniers. Il en résulte des contestations de plus en plus fréquentes entre producteurs de jus et utilisateurs. Cela porte un grave préjudice à la consommation des jus de raisin.

On admet généralement que tous les traitements comportant un chauffage (pasteurisation et désulfitation en particulier) peuvent être à l'origine de la formation de ce corps en quantités plus ou moins importantes.

Par ailleurs, la présence de l'hydroxyméthylfurfural dans les produits alimentaires a été maintes fois signalée : vinaigres, vins, croûte de pain, laits en poudre, vins de dessert, caramel et produits auquel il est incorporé.

Si dans certains cas il est responsable de défauts organoleptiques (brunissement et goût de « cuit » des jus de fruits), dans beaucoup d'autres sa présence ne semble pas préjudiciable à la valeur alimentaire ou à la présentation du produit fini.

L'hydroxyméthylfurfural peut, ainsi que l'a rappelé l'un de nous (COLLON, 1962) relever de deux origines :

1° La réaction de MAILLARD se manifestant au cours du stockage et du vieillissement.

2° La dégradation thermique des sucres, qui peut intervenir au cours de la préparation même des jus.

Dans le présent travail, on a recherché et dosé l'hydroxyméthylfurfural dans des jus de raisin de préparation et d'origines diverses : jus désulfités, jus pasteurisés, jus commerciaux. Un deuxième mémoire s'efforcera de déterminer l'origine de ce constituant que l'on peut déceler dans certains jus de raisin.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

On indiquera, d'une part la nature des jus ayant fait l'objet des recherches, d'autre part les méthodes de recherche et de dosage utilisées.

1° LES JUS DE RAISIN

Ils ont été classés en trois groupes suivant leur mode de préparation : jus désulfités à la Station au moyen du désulfiteur INRA, jus pasteurisés, jus commerciaux.

On a en outre étudié deux concentrés de jus de raisin commerciaux.

a) *Jus désulfités à la Station*

Ces jus ont été préparés au moyen du désulfiteur INRA type semi-industriel : débit 40-50 l/h, à une température de 85°C sous un vide de 32 cm de mercure. Le temps moyen de passage des jus dans l'appareil est de l'ordre de 2 minutes en fonctionnement normal.

Les jus ainsi désulfités étaient immédiatement embouteillés à chaud (bouteilles de 250 ml ou 1l), les flacons étant fermés par des capsules métalliques type couronne, munies d'un spot de caoutchouc évitant tout contact du métal et du jus.

Une première série de jus a été désulfitée en janvier 1958, embouteillée aussitôt et stockée depuis cette date, à température ambiante.

Une deuxième série a été désulfitée en janvier 1960 et stockée depuis cette date.

Enfin une troisième série a été désulfitée de janvier à avril 1961 et les jus obtenus stockés dans les mêmes conditions que ci-dessus.

On a ainsi constitué 3 lots :

Lot n° 1 : Jus désulfités en janvier 1958. Durée de stockage : 3 ans.

Lot n° 2 : Jus désulfités en janvier 1960. Durée de stockage : 1 an.

Lot n° 3 : Jus désulfités en 1961. Durée de stockage : de quelques jours à 4 mois.

b) *Jus pasteurisés*

Ces jus, tous de cépages purs, ont été obtenus à la vendange 1960 par pression modérée du raisin à l'aide d'un pressoir à main. Seul le jus de goutte était recueilli, embouteillé en flacons de 250 ml bouchés comme précédemment avec des capsules type couronne munies de leur spot de caoutchouc, puis pasteurisés immédiatement sans désaération préalable.

La pasteurisation a été réalisée au B.-M. à 70°C pendant 30 minutes.

Il faut signaler le caractère « artisanal » de cette opération, qui n'a pas les qualités de la pasteurisation commerciale (pasteurisation à haute température pendant un temps extrêmement court).

c) *Jus commerciaux*

Ils ont été achetés dans le commerce local ou proviennent directement d'usines. Tous sont des produits français à l'exception du n° 13 qui est d'origine canadienne.

Le jus n° 14 est présenté en boîte métallique de 130 ml environ ; tous les autres sont en bouteilles capsulées.

Neuf jus (n^{os} 1 à 9 inclus) proviennent de mutés désulfités au moyen de divers appareils industriels ; deux ont été préparés par le froid (n^{os} 10 et 11) ; pour tous les autres (n^{os} 12 à 15), le procédé de fabrication nous est inconnu.

d) *Concentrés de jus de raisin*

Il s'agit de deux concentrés industriels titrant 36° Bé.

2° Les méthodes utilisées

Pour la recherche de l'hydroxyméthylfurfural, on a utilisé la réaction de Fiehe, à la résorcine chlorhydrique (Fiehe, 1908) et la chromatographie sur papier, suivant la technique préconisée par les Services Officiels Allemands de Contrôle des Importations (Weger, 1957).

Le dosage a été effectué par la méthode colorimétrique de Winkler (Winkler, 1955).

Rappelons que les deux méthodes de recherches utilisées (réaction de Fiehe et méthode chromatographique) sont peu sensibles. Elles fournissent en effet des résultats négatifs pour des jus renfermant jusqu'à 20 mg/litre d'hydroxyméthylfurfural. La méthode colorimétrique de Winkler, sensible donne des résultats positifs pour des teneurs de 1 mg/litre. Mais on se heurte à deux difficultés majeures : d'une part, dans le cas de jus rouges, la défécation, indispensable, aboutit rarement à un filtrat incolore. Par ailleurs, entraînant une dilution, la défécation rend très aléatoire le dosage de l'hydroxyméthylfurfural dans des jus à faibles teneurs en ce constituant.

La défécation mercurique, qui conduit à un filtrat absolument incolore (Semichon, Flanzy, 1926) n'est pas utilisable dans ce cas.

Selon Koch et Kleesaat (1961), la présence d'anhydride sulfureux dans le milieu perturbe le dosage pratiqué selon la technique de Winkler, la combinaison bisulfitique masquant l'hydroxyméthylfurfural à ses réactifs habituels. Pour y remédier, ces deux auteurs proposent un traitement au perhydrol en milieu alcalin pour détruire la combinaison bisulfitique et oxyder l'anhydride sulfureux libéré. Ils opèrent de la façon suivante :

A 100 ml de jus à essayer, on ajoute 2 ml de soude 2N de façon à amener le jus à pH 8,0, puis 2 ou 3 ml d'une solution d'eau oxygénée à 3 p. 100. On abandonne deux jours à température ordinaire et procède ensuite au dosage selon la technique de Winkler.

On a appliqué la modification de Koch et Kleesaat a cinq jus blancs désulfités à la Station avec le désulfiteur INRA, et dans lesquels on n'avait pas pu déceler d'hydroxyméthylfurfural.

Après deux jours à température ambiante, la réaction colorimétrique de Winkler était encore négative.

On a alors contrôlé l'action de l'eau oxygénée en milieu alcalin sur des solutions pures d'hydroxyméthylfurfural (origine : Flucka).

A cet effet, une gamme de solutions d'hydroxyméthylfurfural à concentrations croissantes : 4, 8, 16, 24, 48, et 96 mg/litre a été préparée. Une gamme identique a été préparée et traitée par la soude 2N et l'eau oxygénée à 3 p. 100, dans les mêmes conditions que ci-dessus.

Après séjour de 48 heures à températures ambiante, on a dosé l'hydroxyméthylfurfural dans les deux séries de concentrations par la méthode de Winkler.

Les résultats obtenus, tant sur la série témoin que pour la série traitée au perhydrol en milieu alcalin, sont réunis dans le tableau 1.

TABLEAU I

Hydroxyméthylfurfural en mg/litre		
Série témoin	Série traitée	Perte p. 100
4	2	50
8	5	37,5
16	12	25
24	18	25
48	39	18,7
96	82	14,5

TABLEAU 2

	Acidité totale SO_4H_2 g/l	Sucres g/litre	Réaction de FIEHE	Chromatographie	Hydroxyméthylfurfural mg/litre	Observations Dégustation
A) Jus désulfités						
n° *date de désulfitation*						
1 1958	5,7	156	négative	négative	8	usé
2 idem	6,8	180	idem	idem	10,5	idem
3 ”	4,6	162	”	”	9	”
4 1960	4,0	159	”	”	0	agréable
5 idem	4,3	162	”	”	0	idem
6 ”	8,6	132	”	”	0	”
7 1961	5,0	156	”	”	0	”
8 idem	4,5	162	”	”	0	”
9 ”	4,7	165	”	”	0	très agréable, frais
10 ”	5,0	158	”	”	0	idem
11 ”	4,6	156	”	”	0	”
B) Jus pasteurisés						
1 70°C-30 minutes	7,6	162	négative	négative	0	aspect défectueux,
2 idem	5,4	148	idem	idem	0	plat, sans caractère
3 ”	5,6	153	”	”	0	quant à la saveur
4 ”	4,7	168	”	”	0	idem
5 ”	4,3	162	”	”	0	”
6 ”	4,4	183	”	”	0	”
7 ”	3,2	154	”	”	0	”

TABLEAU 3

	Acidité totale SO_4H_2 g/l	Sucres g/litre	Réaction de FIEHE	Chromatographie sur papier	Hydroxyméthylfurfural mg/litre	Observations Dégustation
C) *Jus commerciaux*						
1 Désulfité	6,8	157	négative	négative	20	neutre, plat, sans caractère
2 idem	8,4	149	idem	idem	0	saveur agréable
3 ”	6,5	158	”	”	0	idem
4 ”	5,6	160	”	”	0	”
5 ”	4,8	168	”	”	0	”
6 ”	4,6	158	+++	positive	48	goût de cuit
7 ”	5,0	164	négative	négative	0	saveur agréable et fine de framboise
8 ”	3,95	163	idem	idem	0	agréable
9 ”	4,0	164	”	”	0	idem
10 Froid	4,2	164	”	”	0	”
11 idem	10,2	159	”	”	0	”
12 Procédé non connu	4,6	165	”	positive	26	saveur herbacée très prononcée
13 idem	6,3	154	”	négative	12	saveur particulière au Concord
14 ”	4,4	169	++	positive	52	saveur herbacée très prononcée (boîte)
15 ”	4,6	152	négative	négative	0	agréable
D) *Concentrés de raisin*						
1	22,4	36° Bé	+++	positive	185	
2	18,6	36° Bé	+++	idem	169	

On constate donc que le traitement au perhydrol préconisé par KOCH et KLEESAAT provoque une perte en hydroxyméthylfurfural dosé, perte non proportionnelle à la quantité d'hydroxyméthylfurfural mise en jeu, mais d'autant plus grande que cette quantité est plus élevée.

On ne tiendra pas compte de cette modification dans tout ce qui suit ; l'hydroxyméthylfurfural sera dosé selon la technique originale de WINKLER.

RÉSULTATS OBTENUS

Le tableau 2 groupe les résultats obtenus dans la recherche et le dosage de l'hydroxyméthylfurfural en ce qui concerne les jus désulfités et les jus pasteurisés ; le tableau 3 donne les mêmes indications pour les jus commerciaux et les deux concentrés de jus de raisin.

DISCUSSION ET CONCLUSION

a) *Dégustation des jus*

Les jus expérimentés ont des caractères organoleptiques et gustatifs très variés.

Jus désulfités. — Les jus désulfités en 1960 et 1961 sont agréables à déguster, particulièrement ceux préparés en 1961 qui sont très fruités. Mais les jus désulfités en 1958 ont un aspect défectueux et présentent un goût d'oxydé assez prononcé. Ils donnent l'impression de jus « usés ». Or ces jus, lors de leur préparation en 1958, avaient donné toute satisfaction à la dégustation. Il faut donc admettre qu'un stockage prolongé est préjudiciable aux qualités gustatives des jus de raisin. Il est par suite rationnel de les préparer et les conditionner en bouteilles au fur et à mesure des besoins.

Jus pasteurisés. — Tous sont défectueux, peu agréables à déguster ; ils ont perdu tout caractère de fraîcheur et tout arôme. Rappelons, comme nous l'avons signalé plus haut, le caractère « ménager » de leur préparation. Ces constatations n'ont rien d'absolu.

Jus commerciaux. — Leur saveur est très variable. Le n° 1 est neutre, plat, sans caractère ; le n° 6 a un goût de cuit assez prononcé ; le n° 7 une saveur très fine de framboise. Deux (n^{os} 12 et 14) ont une saveur herbacée nette, particulièrement le n° 14 (jus en boîte) ; le n° 13 présente la saveur caractéristique du cépage Concord.

b) *Composition des jus de raisins*

— Parmi les *jus désulfités à la Station,* trois contiennent de petites quantités d'hydroxyméthylfurfural. Ce sont eux qui ont été désulfités en 1958 et stockés depuis cette date.

Aucun des autres jus, préparés dans les mêmes conditions, mais stockés pendant des temps moins longs (de quelques jours à deux ans) ne renferme d'hydroxyméthylfurfural décelable par les méthodes utilisées. On doit donc déduire que la présence d'hydroxyméthylfurfural dans les jus désulfités en 1958 n'est pas imputable à l'opéra-

tion de désulfitation ; par contre elle est vraisemblablement liée à la durée du stockage puisque l'on sait que ce corps est susceptible de se former au cours du vieillissement. Il faut noter toutefois que les doses d'hydroxyméthylfurfural sont faibles étant donné la durée prolongée du stockage.

— Aucun des *jus pasteurisés* ne renferme d'hydroxyméthylfurfural. Nous avons souligné plus haut les conditions défectueuses de leur préparation. L'absence d'hydroxyméthylfurfural dans ces jus permet de conclure que le chauffage, même prolongé, à température égale à 70°C et à fortiori à température plus basse ne provoque pas la formation de ce corps dans les jus de raisin étudiés.

— En ce qui concerne les *jus commerciaux*, cinq renferment des quantités d'hydroxyméthylfurfural plus ou moins importantes. Deux d'entre eux sont des jus désulfités (n^{os} 1 et 6). Le n° 1 a été préparé à l'aide d'un appareil désulfiteur-concentrateur. En effet, l'eau de constitution d'abord séparée, est recyclée quand il s'agit de produire un jus, mais elle est éliminée quand on veut obtenir un concentré au point que cet appareil a servi à préparer les deux concentrés de raisin étudiés. Le jus obtenu n'est donc en réalité qu'un concentré redilué. On y décèle 20 mg d'HMF /litre.

La technique de désulfitation utilisée pour le jus n° 6 n'est pas précisée. On y a trouvé 48 mg d'HMF par litre.

Les *jus préparés par le froid* ne contiennent pas d'hydroxyméthylfurfural.

Enfin, parmi les jus dont le mode de préparation n'est pas connu, trois renferment des teneurs en hydroxyméthylfurfural respectivement de 26, 52 et 12 mg /litre.

On peut donc formuler les conclusions suivantes :

1° La désulfitation, conduite rationnellement ne provoque pas la formation d'hydroxyméthylfurfural dans les jus de raisin.

2° Le stockage prolongé est préjudiciable aux qualités gustatives des jus de raisin, en même temps qu'il donne naissance à des doses modérées d'hydroxyméthylfurfural. Il est donc recommandable de préparer et conditionner les jus de raisin au fur et à mesure des besoins.

3° La présence de doses importantes d'hydroxyméthylfurfural dans des jus de raisin désulfités n'ayant pas subi de stockage est imputable à une faute de technique.

Reçu pour publication en avril 1962

SUMMARY

STUDY OF THE OCCURRENCE OF HYDROXYMETHYLFURFURAL IN GRAPE JUICE

Hydroxymethylfurfural was determined and assayed in grape juice from various origins and manufactured through various procedures. This was done with FIEHE's reaction, with paper chromatography and with WINKLER's colorimetric method.

Particular attention was given to products obtained from juice which had been sulphurated and then desulphurated. The amount of hydroxymethylfurfural was less than 10 mg per liter in grape juice which had been stored for three years after desulphuration (table 2). In this case, the existence of hydroxymethylfurfural is due to the lengthy storage and not to the manufacturing process. Much larger amounts were found in a series of marketed grape juice (table 3). This should be blamed on technical failure. It is possible to manufacture hydroxymethylfurfural-free grape juice by desulphuration, provided it is performed to accurate standards.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

COLLON Y., 1962. L'hydroxyméthylfurfural dans les jus de raisin. Formation et méthodes de dosage. *Ann. Technol., agric.* **11**, 167-174.

FIEHE J., 1908. Eine Reaktion zur Erkennung und Unterscheidung von Kunsthonigen und Naturhonigen. *Z. Unters. der Nahrungs- und Gemüsmittel*, n° 16, 75-77.

KOCH J., KLEESAAT R., 1961. Über die Bildung und Bestimmung von 5-Hydroxymethylfurfurol in Fruchtsäften. *Fruschtsaft-Industrie*, **6**, 107-127.

SEMICHON L., FLANZY M., 1926. Recherches sur la défécation des liquides sucrés par les sels mercuriques. *Ann. Fals. Fraudes*, **19**, 208-226.

WEGER B., 1957. Der analytische Nachweiss von Konzentratensusatz. *Fruchtsaft-Industrie*, **2**, n° 4, 128.

WINKLER O., 1955. Beitrag zum Nachweiss und zur Bestimmung von Oxymethylfurfurol in Honig und Kunsthonig. *Z. Lebensmitt. Unters. Forsch.*, **102**, 161.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (3), 235-244.

IDENTIFICATION DES LEVURES D'UN MOÛT DE BEAUJOLAIS AU COURS DE SA FERMENTATION

P. BRÉCHOT, J. CHAUVET, H. GIRARD

avec la collaboration technique de Mme Edith LEDUC et Mlle Nicole PRUDHOMME.

Laboratoire des Levures, Institut Pasteur, Paris ;
Laboratoire des Établissements CHAUVET *et Cie, La Chapelle-de-Guinchay (Saône-et-Loire)*

SOMMAIRE

Au cours des années 1958-59-60 plusieurs centaines de souches de levures ont été isolées et identifiées à partir d'un moût de Beaujolais en voie de fermentation (Vignoble Bel Avenir à la Chapelle de Guinchay, Saône-et-Loire). Les résultats obtenus permettent de conclure que la microflore levurienne étudiée est relativement pauvre en levures apiculées appartenant au genre *Kloeckera*, le genre *Hanseniaspora* est totalement absent.

Depuis un certain nombre d'années les œnologues se sont préoccupés de l'identification botanique des espèces levuriennes que l'on peut isoler dans les diverses régions viticoles : américaine (MRAK et MCCLUNG, 1940 ; SCHEFFER et MRAK, 1951 ; VEGA, 1955), australienne (FORNACHON, 1953), sud-africaine (VAN ZYL et DU PLESSIS, 1961), européenne (ZIMMERMANN, 1939 ; MARQUES GOMES, 1949 ; KRIMBAS et DANIDES, 19550).

En Italie, ces travaux taxonomiques ont pris une grande ampleur, commencés par DE ROSSI, (1935), ils ont été continués et développés par CASTELLI et ses élèves (CASTELLI, 1954). Ces derniers auteurs ont fait une étude écologique très poussée des levures de fermentation vinaire établissant un parallélisme entre latitude, altitude

et la sporulation : les régions chaudes possèdent une microflore plus riche en espèces sporogènes.

En France, Mlle DOMERCQ de la Station œnologique de Bordeaux a été la première à entreprendre un travail similaire, s'appliquant à la région girondine (DOMERCQ, 1956).

Pendant les années 1958, 59 et 60 nous avons isolé et identifié un certain nombre de souches d'un moût de Beaujolais au cours de sa fermentation. Il s'agit de raisins *Gamay noir* à jus blanc du vignoble Bel Avenir à la Chapelle-de-Guinchay (S.-et-L.). Ce vignoble appartient aux Établissements CHAUVET Frères et Cie. Le vin a l'appellation Beaujolais-Villages.

Cette étude a porté sur les moûts, vinifiés soit par la méthode de la macération carbonique soit par la méthode traditionnelle beaujolaise ; celle-ci comporte un léger foulage initial et quelques remontages. Dans le cas de la macération carbonique, le pressurage a lieu après 6 à 8 jours de fermentation ; dans le cas de la vinification traditionnelle après 3 jours de fermentation.

La fermentation a lieu dans des cuves tronconiques en bois de 60 Hl, fermées à la partie supérieure, dans laquelle est ménagé un orifice qui permet le remplissage. Pour la vinification par macération carbonique, cet orifice est clos par une trappe jointée ; pour la vinification traditionnelle, la trappe est remplacée par une claire-voie, toile métallique laquée maintenue dans un cadre de bois.

Les années 1958 et 1960 ont été pluvieuses, la présence de grains pourris a entraîné un léger sulfitage préliminaire ; par contre en 1959, la vendange fut parfaitement saine.

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES

Les échantillons de moût étaient prélevés à différentes époques de la fermentation par le robinet de tire au bas de la cuve.

Immédiatement avant le prélèvement, on soutirait 1 à 2 litres de moût. Le prélèvement se faisait dans un flacon de 125 ml stérile ou propre, rincé plusieurs fois avec du moût s'écoulant du robinet de tire.

Les isolements ont été effectués, au moyen d'une anse de platine, par le procédé classique de dilution sur moût de raisin, pasteurisé 30 minutes à 75°C, gélatiné à 12 p. 100. La boîte de Pétri choisie pour les isolements comportait autant que possible une *dizaine de colonies parfaitement séparées, chacune d'elles était repiquée sur eau de touraillons gélosée.*

L'identification botanique de la souche se faisait à partir de cette culture, selon les tests taxonomiques établis par LODDER et KREGER VAN RIJ (1952) :

Sporulation sur milieu de Gorodkowa et blocs de plâtre ;
Dimensions des cellules ;
Formation d'un voile ;
Fermentation des sucres : glucose, saccharose, maltose, raffinose (GIRARD et de CHARON, 1959), lactose et galactose ;
Assimilation des sucres : glucose, saccharose, maltose, lactose, galactose (GIRARD et LEDUC, 1960) ;
Assimilation des nitrates ;
Filamentisation sur pomme de terre glucosée.

RÉSULTATS

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux ci-joints, où il a été tenu compte de l'année d'isolement et du mode de vinification.

Le tableau I résume la répartition globale des souches identifiées, classées, suivant leur aptitude à sporuler, en genres et espèces.

TABLEAU I

	1958 M. C. (*) (% (***))	1959 Cuve 7 M. C. (%)	1959 Cuve 8 M. C. (%)	1959 Cuve 9 V. T. (**) (%)	1960 Cuve 9 M. C. (%)	1960 Cuve 7 V. T. (%)
Levures asporogènes :						
B. vini		1,8		9		
Endomyces	2,5					
C. ... (non identifié)						1,5
C. guillermondii	5	0,9				
C. krusei					1,7	1,5
C. melinii		4,5	5	3,5		
C. mycoderma	7,5	12,5	12,9	8		
C. pelliculosa						4,4
C. robusta		6,2	4	4,7	5	17,6
C. solani						2,9
C. tropicalis						
C. utilis		0,9		1,2		
K. apiculata	17,5	7	7,8	3,5	1,7	5,9
K. jensenii	2,5					
K. lafarii			1			1,5
T. bacillaris	2,5			3,5		
T. colliculosa		0,9	1,2	1,2		
T. dattila				1,2		
T. famata	2,5			1,2		
T. holmii	2,5					
T. saké						8,8
T. stellata					8,1	
Rh. mucilaginosa	2,5					
Levures sporogènes :						
Endomycopsis Javannensis			1			
Hansenula schneggii				1,2		
Sacch. cerevisiae, var. *ellip.*	35	63,6	60	58,8	46,7	42,6
Sacch. chevalieri			1	1,2	5	
Sacch. exiguus	2,5					
Sacch. fructuum	2,5					
Sacch. heterogeneicus			1			
Sacch. italicus	2,5		1,9		1,7	
Sacch. mellis						1,5
Sacch. oviformis	2,5					1,5
Sacch. rosei			1			1,5
Sacch. steineri	7,5	0,9	1,9	1,2	28,4	8,8
Sacch. veronae	2,5	0,9	1		1,7	

(*) M. C. = Macération carbonique.
(**) V. T. = Vinification traditionnelle.
(***) % des souches identifiées.

Les tableaux 2, 3 et 4 indiquent la succession des souches au cours de la fermentation ; au moment de chaque prélèvement on a noté la densité du moût ainsi que la température observée au bas de la cuve.

TABLEAU 2

	I	II	III	IV	V
Année 1958	1/10/58 t = 18°C $D\acute{e}_{15}$ = 1 088,7	3/10/58 t = 17°C $D\acute{e}_{15}$ = 1 085,5	6/10/58 t = 20,5°C $D\acute{e}_{15}$ = 1 033,3	9/10/58 t = 23°C De_{15} = 1 005	23/10/58 après pressurage
Macération Carbonique	*Asp.* 3 2 *C. mycoder.* 1 *K. jensenii*	*Asp.* 6 5 *K. apicu.* 1 *T. bacil.*	*Asp.* 5 1 *C. mycod.* 2 *K. apicu.* 1 *R. mucil.* 1 *T. holmii*	*Asp.* 3 1 *C. guil.* 1 *Endomy.* 1 *T. famata*	*Asp.* 1 1 *C. guil.*
Cuve 9	*Sp.* 1 1 *S. oviform.*	*Sp.* 2 1 *S. stein.* 1 *S. veron.*	*Sp.* 5 4 *S. ellip.* 1 *S. exigu.*	*Sp.* 12 10 *S. ellip.* 1 *S. fructu.* 1 *S. italic.*	*Sp.* 2 2 *S. stein.*

Le tableau 5 montre la répartition des souches classées suivant leur genre, trouvées au début de la fermentation, au cours de la fermentation (généralement au milieu de celle-ci) et vers la fin de la fermentation, lorsque la densité est voisine de 1 000.

En vue de faire une synthèse de ces résultats (tableau 6 et représentation triangulaire fig. 1), les souches ont été classées dans les groupes suivants :

Groupe I. — Levures à pouvoir alcooligène élevé :
Levures sporogènes : Genre *Saccharomyces*.

Groupe II. — Levures apiculées à pouvoir alcooligène faible (1).
Levures asporogènes : Genre *Kloeckera*.

Groupe III. — Levures à pouvoir oxydatif (formant des esters, des voiles ou anneaux en culture liquide), à pouvoir respiratoire intense, à pouvoir alcoolique variable :
Levures sporogènes (2) : Genres *Hansenula*, (*Endomycopsis*) ;
Levures asporogènes : Genres *Brettanomyces*,
— *Candida*,
— *Endomyces*,
— *Rhodotorula*,
— *Torulopsis*.

(1) Aucune levure apiculée sporogène appartenant au genre *Hanseniaspora* n'a été isolée. CASTELLI a décelé cette levure dans les régions chaudes de l'Italie et en Israël (CASTELLI, 1954).

(2) Aucune espèce du genre *Pichia* n'a été identifiée, il est admis que *P. membranefaciens* est la forme sporulée de *Candida Mycoderma* (LODDER et KREGER-VAN RIJ, 1952), on remarque que celle-ci a été trouvée plusieurs fois au cours de nos essais.

TABLEAU 3

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Année 1959 Macération Carbonique Cuve 7	21/9/59 t = 19,5°C $D^{é}_{15}$ = 1 089,8 *Asp.* 8 8 *K. apicu.* *Sp.* 2 2 *S. ellip.*	22/9/59 t = 20°C $D^{é}_{15}$ = 1 086,9 *Asp.* 14 2 *C. mel.* 4 *C. mycod.* 7 *C. robus.* 1 *C. utilis* *Sp.* 3 3 *S. ellip.*	23/9/59 t = 21,5°C $D^{é}_{15}$ = 1 060,2 *Asp.* 15 1 *C. guill.* 2 *C. mel.* 10 *C. mycod.* 2 *B. vini* *Sp.* 0	24/9/59 t = 23,5°C $D^{é}_{15}$ = 1 029,7 *Asp.* 0 *Sp.* 13 13 *S. ellip.*	25/9/59 t = 26°C $D^{é}_{15}$ = 1 013,3 *Asp.* 0 *Sp.* 1 : 10 *S. ellip*	28/9/59 t = 26°C $D^{é}_{15}$ = 1 005,3 *Asp.* 0 *Sp.* 13 13 *S. ellip.*	29/9/59 t = 31,5°C $D^{é}_{15}$ = 1 020,8 *Asp.* 2 1 *C. mel.* 1 *T. collic.*	30/9/59 t = 33,5°C $D^{é}_{15}$ = 1 004,5 *Asp.* 0	12/10/59 lies *Asp.* 0
Année 1959 Macération Carbonique Cuve 8	21/9/59 t = 22°C D_{15} = 1 074,3 *Asp.* 5 2 *C. mel.* 2 *C. mycod.* 1 *C. robus.* *Sp.* 9 9 *S. ellip.*	23/9/59 t = 22°C $D^{é}_{15}$ = 1 059,3 *Asp.* 11 1 *C. mel.* 9 *C. mycod.* 1 *C. robus.* *Sp.* 1 1 *S. ellip.*	24/9/59 t = 23°C $D^{é}_{15}$ = 1 047,6 *Asp.* 5 2 *C. mycod.* 1 *C. robus.* 2 *K. apicu.* *Sp.* 8 1 *S. cheva.* 6 *S. ellip.* 1 *S. itali.*	25/9/59 t = 24,5°C $D^{é}_{15}$ = 1 039,9 *Asp.* 4 1 *C. robus.* 3 *K. apicu.*	28/9/59 t = 24,5°C D_{15} = 1 016,9 *Asp.* 5 1 *C. mel.* 3 *K. apicu.* 1 *K. lafar.* *Sp.* 9 8 *S. ellip.* 1 *S. rosei.*	12/10/59 lies *Asp.* 0 *Sp.* 4 1 *E. javan.* 2 *S. ellip.* 1 *S. itali.*	*Sp.* 10 9 *S. ellip.* 1 *S. veron.*	*Sp.* 19 19 *S. ellip.*	*Sp.* 4 3 *S. ellip.* 1 *S. stein.*
Année 1959 Vinification traditionnelle Cuve 9	20/9/59 t = 23°C $D^{é}_{15}$ = 1 093,6 *Asp.* 9 3 *B. vini.* 2 *C. mel.* 3 *K. apicu.* 1 *T. famata* *Sp.* 5 5 *S. ellip.*	21/9/59 t = 21,5°C $D^{é}_{15}$ = 1 091,2 *Asp.* 0 *Sp.* 10 1 *H. schreg.* 9 *S. ellip.*	22/9/59 t = 26°C $D^{é}_{15}$ = 1 060,3 *Asp.* 7 3 *C. mycod.* 2 *C. robus.* 1 *T. bacil.* 1 *T. datti.* *Sp.* 9 1 *S. cheva.* 8 *S. ellip.*	23/9/59 t = 28°C $D^{é}_{15}$ = 1 032,8 *Asp.* 16 5 *B. vini* 1 *C. mel.* 4 *C. mycod.* 2 *C. robus.* 1 *C. utilis* 2 *T. bacil.* 1 *T. colli.* *Sp.* 0	24/9/59 t = 28°C $D^{é}_{15}$ = 1 013,8 *Asp.* 0 *Sp.* 11 11 *S. ellip.*	25/9/59 t = 27°C $D^{é}_{15}$ = 1 000 *Asp.* 0 *Sp.* 10 10 *S. ellip.*	29/9/59 t = 24,5°C $D^{é}_{15}$ = 998,9 *Asp.* 0 *Sp.* 3 2 *S. ellip.* 1 *S. stein.*	10/10/59 Lies *Asp.* 0 *Sp.* 5 5 *S. ellip.*	

TABLEAU 4

	I	II	III	IV	V	VI	VII
Année 1960	(*)	(matin)	(soir)				
	20/9/60	24/9/60	24/9/60	25/9/60	28/9/60	3/10/60	25/10/60
	t = 15°C	t = 17°C	t = 19°C	t = 19°C	t = 26°C	t = 19°C	lies
	$D^{é}_{15}$ = 1 072	$D^{é}_{15}$ — 1 064,3	$D^{é}_{15}$ = 1 038,7	$D^{é}_{5}$ = 1 006,7	$D^{é}_{15}$ = 1 002,3	$D^{é}_{15}$ = 998,7	
	Asp. 5	*Asp.* 1	*Asp.* 3	*Asp.* 0	*Asp.* 0	*Asp.* 1	*Asp.* 0
	1 *C. robus.*	1 *C. robus.*	1 *C. krusei*			1 *C. robus.*	
	4 *T. stell.*		1 *K. apicu.*				
Macération			1 *T. stell.*				
Carbonique	*Sp.* 0	*Sp.* 7	*Sp.* 9	*Sp.* 10	*Sp.* 11	*Sp.* 7	*Sp.* 5
		1 *S. cheva.*	1 *S. cheva.*	7 *S. ellip.*	2 *S. ellip.*	1 *S. cheva.*	3 *S. ellip.*
		5 *S. ellip.*	7 *S. ellip.*	3 *S. stein.*	9 *S. stein.*	4 *S. ellip.*	1 *S. stein.*
		1 *S. stein.*	1 *S. stein.*			1 *S. itali.*	1 *S. veron.*
						1 *S. stein.*	
Année 1960	(**)	(matin)	(soir) (***)				
	23/9/60	25/9/60	25/9/60	26/9/60	28/9/60	3/10/60	25/10/60
	t = 16,5°C	t = 17°C	t = 18°C	t = 22°C	t = 28°C	t = 19°C	lies
	$D^{é}$ = 1 077,2	$D^{é}_{15}$ = 1 073,3	$D^{é}_{1}$ = 1 064,5	$D^{é}_{15}$ = 1 033,3	$D^{é}_{1}$ = 1 008,8	$D^{é}_{15}$ = 998,7	
	Asp. 12	*Asp.* 5	*Asp.* 8	*Asp.* 2	*Asp.* 4	*Asp.* 0	*Asp.* 0
	3 *C. robus.*	1 *C. albic.*	1 *C. pellic.*	1 *C. pellic.*	4 *C. robus.*		
	1 *C. solani*	1 *C. krusei*	1 *C. solan.*	1 *K. apicu.*			
	3 *C. tropi.*	2 *C. robus.*	2 *K. apicu.*				
Vinification	1 *K. apicu.*	1 *C. pellic.*	4 *T. saké*				
traditionnelle	2 *K. lafar.*						
	2 *T. saké*						
	Sp. 0	*Sp.* 6	*Sp.* 6	*Sp.* 3	*Sp.* 8	*Sp.* 8	*Sp.* 7
		4 *S. ellip.*	3 *S. ellip.*	2 *S. ellip.*	7 *S. ellip.*	8 *S. ellip.*	5 *S. ellip.*
		1 *S. melli.*	3 *S. stein.*	1 *S. ovifor.*	1 *S. stein.*		2 *S. stein.*
		1 *S. rosei*					

(*) Chauffage et sulfitage 2,5 g/hl.
(**) Chauffage à 22°C et sulfitage 7,5 g/hl.
(***) Après remontage.

TABLEAU 5

	Levures asporogènes						Levures sporogènes. Genre
	Genres :			Autres genres :			
	C.	K.	T.	B.	E.	R.	S.
Année 1958 :							
Macération carbonique. Cuve 9.							
Avant fermentation	16,6	49,9	8,3				25
Sucre disparu : 72 %	10		10		20	10	50
Fin de fermentation	11,1		5,5		5,6		77,7
Année 1959							
Macération carbonique. Cuve 9.							
Début fermentation, sucre disparu : 10 %	51,8	29,6					18,5
Sucre disparu : 45 %	86,5			13,5			
Fin de fermentation							100
Macération carbonique. Cuve 8.							
Début fermentation, sucre disparu : 29 %	35,5						64,2
Sucre disparu : 52 %	56	8					36
Fin de fermentation							100
Traditionnelle. Cuve 9.							
Début fermentation, sucre disparu 7 %	14,2	21,4	7	21,4			36
Sucre disparu : 45 %	49,9		18,8	31,3			
Fin de fermentation							100
Année 1960							
Macération carbonique. Cuve 9.							
Début fermentation	20		80				75
Sucre disparu : 55 %	8,3	8,3	8,4				94,7
Fin de fermentation	5,3						
Traditionnelle. Cuve 7.							
Début fermentation	58,6	24,9	16,5				60
Sucre disparu : 66 %	20	20					100
Fin de fermentation							

C. = *Candida*, K. = *Kloeckera*, T. = *Torulopsis*, B. = *Brettanomyces*, E. = *Endomyces*, R. = *Rhodotorula*, S. = *Saccharomyces*.

Les chiffres indiquent le pourcentage de souches isolées au cours de la phase de fermentation considérée.

TABLEAU 6

	1958 M. C. (*) (% (***))	1959 Cuve 7 M. C. (%)	1959 Cuve 8 M. C. (%)	1959 Cuve 9 V. T. (**) (%)	1960 Cuve 9 M. C. (%)	1960 Cuve 7 V. T. (%)
Groupe I	55	65,4	68	61,2	83,3	56
Groupe II	20	7	8,7	3,5	1,7	7,4
Groupe III	25	27,6	23,3	35,3	15	36,6

(*) M. C. = Macération carbonique. (**) V. T. = Vinification traditionnelle. (***) % des souches identifiées.

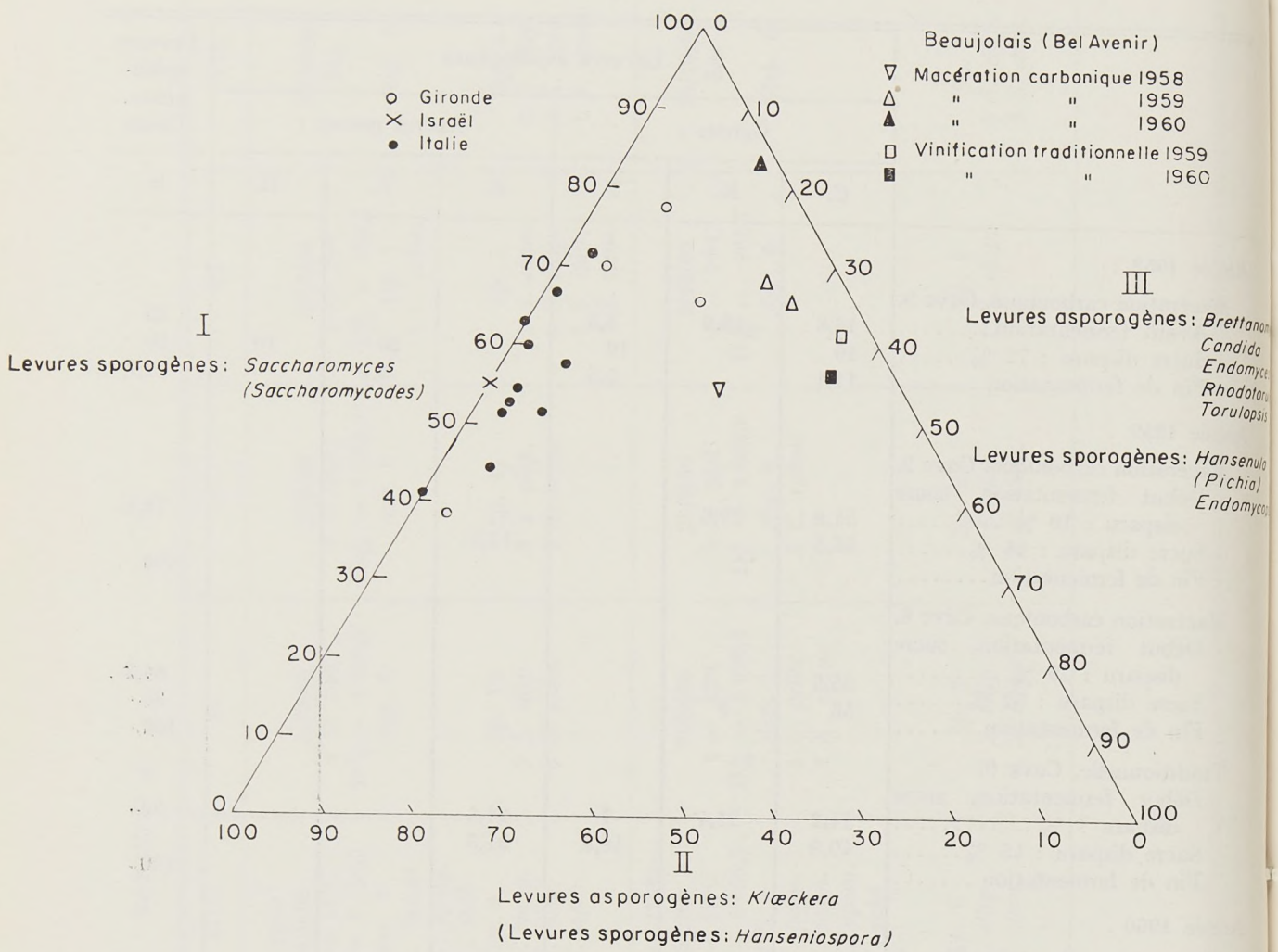


FIG. 1.

CONCLUSIONS

Ces résultats permettent les conclusions suivantes : On peut noter tout d'abord que la composition de la microflore est assez variable suivant les années, néanmoins les points suivants se dégagent de cette étude :

1) Au fur et à mesure que la fermentation se poursuit, comme il est classique de le constater, les levures asporogènes ont tendance à disparaître devant les levures sporogènes (tableaux 2, 3, 4, 5).

Parmi ces dernières le genre *Saccharomyces* est pour ainsi dire exclusif (tableau 1), l'espèce *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* est l'espèce dominante ce qui est la règle en œnologie.

On peut remarquer la deuxième place occupée par *Sacch. steineri*.

A l'opposé de Mlle DOMERCQ (1956), *Sacch. oviformis* n'a pas été décelé en fin de fermentation, mais isolé une seule fois en 1958 au début de la fermentation et une autre fois en 1960 au cours de la fermentation (1).

(1) Toutefois il faut ajouter que cette espèce a été retrouvée régulièrement dans des vins de 1959, d'origine voisine. Ces vins étaient restés sucrés et achevaient leur fermentation.

2) Le mode de vinification ne paraît pas modifier très sensiblement la composition de la microflore, bien que dans le cas de la macération carbonique on puisse observer une fréquence relative supérieure des levures sporulées *Saccharomyces* (fig. 1) (tableau 6).

3) La microflore levurienne du vignoble Bel Avenir d'après nos essais, se caractérise essentiellement par sa pauvreté en levures apiculées *Kloeckera* (groupe II) et une richesse relative des levures du groupe III (tableau 6 et fig. 1). Quelques souches de *Candida* ont été identifiées vers la fin de la fermentation (tableaux 2, 3, 4). Ce résultat ne semble pas dépendre de la cuvaison utilisée.

Nous avons fait figurer sur la représentation triangulaire (fig. 1) les points qui correspondent aux résultats obtenus par Mlle DOMERCQ (1956) et CASTELLI (1954). Ces points se répartissent sensiblement dans une même région du triangle mais différente de la précédente : les proportions relatives des levures des groupes II et III sont inversées par rapport à celles que nous avons observées.

Enfin si on fait le rapport des fréquences des souches *Kloeckera* et des souches *Saccharomyces*, (*Kloeck./Sacch.* × 100,) on obtient les chiffres moyens respectifs suivants :

pour le vignoble Bel Avenir, que nous avons étudié,	13,4
pour la région girondine (Mlle DOMERCQ, 1956) (1)	58,2
pour les diverses régions italiennes (CASTELLI, 1954) (1)	76,4

Ces 3 chiffres illustrent encore l'absence relative des levures *Kloeckera* parmi les éléments de la microflore levurienne beaujolaise du vignoble Bel Avenir.

Reçu pour publication en avril 1962.

SUMMARY

IDENTIFICATION OF YEASTS FROM A FERMENTING BEAUJOLAIS MUST

During the years 1958, 1959 and 1960, 469 strains of yeast were isolated and identified from a Beaujolais must (Bel Avenir, from La Chapelle-de-Guinchay, S-et-L.) during the process of wine making by both the carbonic maceration and the traditional Beaujolais method.

A botanical examination of the strains revealed a microflora relatively poor in *Kloeckera* and rich in *Candida* and *Torulopsis* yeasts, irrespective of the method of fermentation employed.

With carbonic maceration a certain increase was observed in the *Saccharomyces* yeasts.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CASTELLI T., 1954. 10e *Congr. intern. indus. agric., Madrid,* **2,** 1891.
DOMERCQ S., 1956. Etude et classification des levures de vin de la Gironde. Thèse Univ. Bordeaux.
FORNACHON J. C. M., 1953. Studies on the sherry flor. Australian Wine Board, Adelaïde.
GIRARD H., CHARON E. de, 1959. *Ann. Technol. agric.,* **8,** 55.
GIRARD H., LEDUC E., 1960. *Ann. Technol. agric.,* **9,** 79.
KRIMBAS B. D., DANIDES V. X., 1950. 6e *Congr. intern. Vigne et Vin.*

(1) Ce rapport a été calculé en additionnant, lorsqu'il l'était nécessaire, les souches *Kloeckera* et les souches *Hanseniaspora* ainsi que les souches *Saccharomyces* et les souches *Saccharomycodes*.

LODDER J., KREGER, VAN RIJ N. J. W., 1952. The yeasts. North Holland Publish Co, Amsterdam.
MARQUES GOMES J. V., 1949. *Anais. Inst. Vinho Porto*, **10**, 51.
MRAK E. M., MC CLUNG L. S., 1940. *J. Bact.*, **40**, 395.
ROSSI C. de, 1935. *Congr. intern. Vigne et Vin*, Lausanne.
SCHEFFER W. R., MRAK E. M., 1951. *Mycopath. Mycol. applic.*, **5**, 236.
VAN ZYL J. A., DU PLESSIS W., 1961. *South Afr. J. Agric. Sci.*, **4**, 3 (d'après B. O. I. V., 1961, **34**, 90).
VEGA R., 1955. *Bol. tec. Fac. Cienc. agrar., Mendoza*, n° 16.
ZIMMERMANN J., 1939. D'après : *Rev. Vitic.*, 1939, **90**, 472.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (3), 245-247.

ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES VINS ROUGES ISSUS DE CÉPAGES RÉGLEMENTÉS

H. BIOL et A. MICHEL

Station œnologique, Centre de Recherches agronomiques du Centre-Est, Beaune (Côte-d'Or)

SOMMAIRE

Cette note est le complément du travail publié en 1961 (H. Biol, A. Michel, 1961).
Les auteurs confirment l'absence du diglucoside du malvidol dans tous les vins issus de *V. vinifera*.

I. — Introduction

Dans le précédent travail, les auteurs indiquaient que trois réglementations régissent l'encépagement du vignoble français.

La réglementation des vins d'appellations d'origine contrôlée et de qualité supérieure prévoit que ceux-ci doivent être obtenus exclusivement à partir de cépages de *V. vinifera*.

Quant aux vins de consommation courante, ils peuvent être obtenus également avec certains hybrides.

Le but du présent travail a été d'examiner les cépages que les auteurs ne possédaient pas les années précédentes.

Quelques hybrides non réglementés on été également joints à la liste, car ils sont couramment cultivés.

II. — Origine et choix des cépages — Vinification

Les cépages ont été collectés dans le Jura, en Bourgogne, et dans la région méridionale.

Les vinifications ont été conduites comme en 1960, selon la technique préconisée par le Comité d'Expérimentation de l'Institut des Vins de Consommation courante.

III. — Techniques chromatographiques

La chromatographie a été réalisée en technique ascendante unidimensionnelle. Trois solvants ont été utilisés :

— Butanol-Acide chlorhydrique de Bieber,
— Tampon de Britton-Robinson,
— Tampon phosphato-phosphorique.

Les chromatogrammes ont été examinés en lumière ultraviolette, en employant deux longueurs d'onde : 2 537 Å et 3 650 Å.

IV. — résultats

On se reportera aux deux tableaux qui indiquent les résultats de l'examen, en lumière ultra-violette =

— d'une part des cépages *V. vinifera*,
— d'autre part des cépages hybrides.

Examen sous lumière U V de 2 537 et 3 650 Å
des vins de divers cépages français et hybrides
(*Résultats complémentaires*)

Vitis vinifera

Nom du cépage	Solvants utilisés		
	Tampon de Britton-Robinson	Tampon phosphato-phosphorique	Butanol HCl
Barbarossa	A	A	A
Gros Béclan	A	A	A
Petit Béclan	A	A	A
Brachet	A	A	A
Brun Fourca	A	A	A
Carcajolo	A	A	A
Mauzac rouge	A	A	A

Hybrides

Nom du cépage	Solvants utilisés		
	Tampon de Britton-Robinson	Tampon phosphato-phosphorique	Butanol HCl
Bu 4687	P	P	P
Bu 4716	P	P	P
B.S. 2667(Colonel)	P	P	P
J. S. 26205	P	P	P
L. 2283	P	P	P
L. 4411	A	A	A
S. 14596	A	A	A
S. 15062	P	P	P
S. V. 2318	P	P	P
S. V. 15174	P	P	P
S. V. 18307	P	P	P
S. V. 18402	P	P	P
S. V. 19439	P	P	P
S. V. 23353	A	A	A

V. — Conclusions générales

1° Dans le précédent travail, il a été constaté que tous les cépages réglementés de *V. vinifera* sont exempts de diglucoside du malvidol. Le présent travail le confirme.

2° Dans la précédente publication, 18 cépages hybrides sur 23 contiennent du diglucoside du malvidol.

Dans le présent travail 11 sur 14 le contiennent.

Au total, 37 hybrides ont été examinés, dont 29 contiennent ce diglucoside.

Reçu pour publication en mai 1962

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Biol H., Michel A., 1961. Étude chromatographique des vins rouges issus de cépages réglementés. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 339-344.

Le Directeur-Gérant : M. L. Cagnac

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 11-1962

Dépôt légal : 4e trimestre 1962. N° d'impression : 129.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (4), 249-269

LE DOSAGE DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE DANS LES VINS

P. JAULMES et R. MESTRES
Faculté de Pharmacie, Montpellier (Hérault)

SOMMAIRE

Les auteurs ont étudié les conditions de la distillation de l'acide cyanhydrique libre et de l'acide cyanhydrique total du ferrocyanure qui peuvent subsister dans le vin à la suite d'un traitement mal fait.

Ils ont ensuite comparé et mesuré la sensibilité, les avantages et les défauts de six méthodes de dosage de traces d'acide cyanhydrique. Ils ont indiqué en détail les méthodes qu'ils estiment les plus pratiques ou les plus sensibles pour ce dosage.

Ils ont ainsi pu déceler de l'acide cyanhydrique, dans la levure alcoolique, les lies, les vins non dépouillés, en quantité toujours inférieure à 0,25 mg par litre de vin.

Des procédés pratiques de contrôle sont indiqués.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — INTÉRÊT PRATIQUE DE L'ÉTUDE

II. — SÉPARATION DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE

1° Séparation de l'acide cyanhydrique libre :
a) entraînement par l'air
b) extraction par diffusion
c) distillation sous vide.

2° Séparation de l'acide cyanhydrique total :
a) condition de la décomposition totale du ferrocyanure de potassium
b) distillation de l'acide cyanhydrique total
c) oxydation des sulfites et concentration de la solution
d) appareil spécial de distillation et de concentration.

III. — MÉTHODES DE DOSAGE

1° Dosage par formation de bleu de Prusse :

méthode de CHELLE et collab.
méthode GETTLER et GOLDBAUM.

2° Dosage par argentimétrie :
cyanoargentimétrie
méthode de CHARPENTIER-VOLHARD.

3° Dosage par la ferroïne :

4° Dosage à l'état d'isopurpurate

5° Méthode fluorescimétrique

6° Méthodes à la phénolphtaline et à la résine de gaïac

7° Méthode d'EPSTEIN
principe de la méthode
technique d'extraction de l'acide cyanhydrique
dosage
sensibilité
préparation des réactifs.

IV. — RÉSULTATS OBTENUS

1° Étude de vins traités par le ferrocyanure de potassium.

2° Étude de vins non traités.

3° Présence d'acide cyanhydrique dans les levures alcooliques, dans les lies, etc.

V. — RECHERCHE D'UN TRAITEMENT ILLICITE PAR LE FERROCYANURE ET CONTRÔLE DES VINS.

1° Estimation de la limite maxima de l'acide cyanhydrique total naturel.

2° Contrôle simple des vins traités par le ferrocyanure de potassium.

3° Choix des méthodes de dosage.

I. — INTÉRÊT PRATIQUE DE L'ÉTUDE

La recherche de l'emploi illicite du ferrocyanure de potassium contre la casse ferrique des vins ou « collage bleu » ou le contrôle d'un tel traitement s'il était licite, nécessite une méthode de dosage très sensible de l'acide cyanhydrique libre et de l'ion ferrocyanogène. Dans ce but nous avons étudié les diverses méthodes de dosage de l'acide cyanhydrique dans les vins, continuant ainsi le premier et remarquable travail de MM. CHELLE, DUBAQUIE et TURBET (1935) sur ce même sujet.

On doit distinguer dans cette opération deux temps : la séparation de l'acide cyanhydrique et son dosage.

II. — SÉPARATION DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE

1. — SÉPARATION DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE LIBRE

a) *Entraînement par l'air*

L'étude faite par M^lle^ SIDELNIK Nelly (1958) a montré que le rendement du barbotage est indépendant de la vitesse de passage de l'air et de la quantité d'HCN traité.

Le volume d'air nécessaire pour entraîner quantitativement HCN dépend essentiellement, pour un barboteur donné, du volume de solution traitée.

L'acidité du vin suffit pour la libération de l'acide cyanhydrique libre.

Pour extraire sans perte la totalité de l'acide cyanhydrique introduit sous forme de cyanure de potassium dans le vin, il est nécessaire de faire barboter respectivement :

10 litres	d'air si l'on utilise	10 ml	de vin
25	—	20	—
30	—	25	—

On extraira 98 p. 100 de l'acide cyanhydrique grâce au barbotage de 60 l d'air si l'on utilise 50 ml de vin et 84 p. 100 de cet acide avec 60 l d'air à partir de 100 ml de vin.

L'acide cyanhydrique entraîné sera capté par une solution alcaline disposée dans un deuxième barboteur à la suite de celui renfermant le vin.

Il convient de ne pas utiliser un trop faible volume de solution alcaline pour que l'efficacité du barbotage soit satisfaisante. 5 ml de solution 0,4 N d'hydroxyde de sodium suffisent.

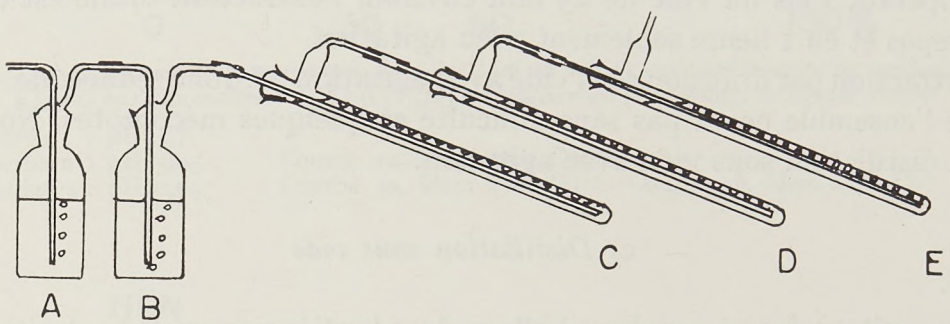


FIG. 1. — *Barboteurs montés pour l'entraînement de l'acide cyanhydrique par l'air*

A contient de la soude à 25 p. 100
B contient de l'eau distillée
C contient 25 ml de vin à analyser
D contient 5 ml de soude 0,4 N
E contient 5 ml de soude 0,4 N

La séparation de l'acide cyanhydrique libre dans le vin sera ainsi réalisée :

La vidange (effectuée trois fois) d'un ballon de 10 l rempli d'eau assure l'aspiration de 30 l d'air qui traversent une série de barboteurs A. B. C.. reliés par des joints en tube de caoutchouc et renfermant respectivement (fig. 1) :

A — de la lessive de soude au 1/4 (épuration de l'air du laboratoire),

B — de l'eau distillée (lavage),

C — 25 ml d'un vin à analyser X,

D — 2 ml d'hydroxyde de sodium N et 3 ml d'eau distillée ou 5 ml hydroxyde de sodium 0,4 N (pour fixation de l'acide cyanhydrique libéré du vin X),

E — 5 ml d'hydroxyde de sodium 0,4 N (barboteur témoin).

On peut analyser un deuxième vin Y au cours de la même opération, en plaçant à la suite de E les barboteurs F et G, non figurés sur la fig. 1 et ainsi garnis :

F — 25 ml d'un vin à analyser Y.

G — 5 ml d'hydroxyde de sodium 0,4 N (pour la fixation de HCN libéré du vin Y).

Les barboteurs C D E F G seront formés par des tubes inclinés, à rodage èmeri très légèrement siliconé, de 15 mm de diamètre et 30 cm de long. L'air pénètre par un tube effilé débouchant à l'extrémité inférieure du barboteur.

Cet appareil a l'avantage de demander peu de surveillance ; mais l'opération étant assez longue (3 à 6 heures), on peut craindre que de petites quantités d'acide cyanhydrique combinées du ferrocyanure ne soient libérées par l'acidité du vin si celle-ci est particulièrement élevée. De plus tout entraînement mécanique accidentel du vin dans le barboteur récepteur oblige à recommencer l'essai.

b) *Extraction par diffusion*

La diffusion simple à température uniforme de HCN dans l'air d'une enceinte close de 1 litre et sa fixation dans une solution alcaline disposée dans cette même enceinte (adaptation de la méthode générale de CONWAY (1950)) a également été étudiée par M^lle^ SIDELNIK (1958).

L'extraction de l'acide cyanhydrique libre du vin est obtenue après 30 h au repos et 4 h seulement si le vin est agité.

En opérant sous un vide de 15 mm environ, l'extraction totale est obtenue en 20 h au repos et en 1 heure seulement avec agitation.

L'extraction par diffusion sous vide avec agitation est donc séduisante, mais l'agitation de l'ensemble ne va pas sans difficulté et quelques mécomptes. Nous lui préférons la distillation sous vide avec agitation.

c) *Distillation sous vide*

Appareil.

L'appareil est formé par deux ballons de 1 l reliés par un tube droit et adaptables l'un à l'autre par un rodage èmeri (diamètre intérieur 30 mm). L'un des ballons est muni d'un robinet tenant le vide et sur lequel on peut adapter un petit entonnoir au moyen d'un raccord en caoutchouc.

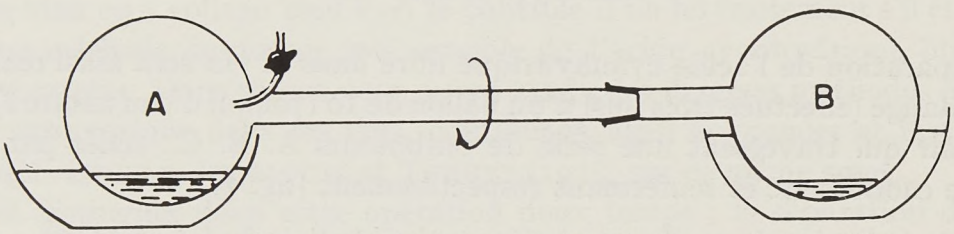


FIG. 2. — *Ballons jumelés pour la distillation à froid de l'acide cyanhydrique libre*

Le tube droit reliant les ballons reposera si possible sur un mécanisme assurant la rotation à vitesse modérée de l'ensemble.

Dans les conditions dans lesquelles s'effectue la distillation, le mélange vin + acide cyanhydrique se comporte dans le ballon chaudière A comme une solution d'acide cyanhydrique dont la constante de volatilité serait voisine de 10 (JAULMES, MESTRES et HENRY, 1958). Il suffit donc de distiller 36,9 p. 100 du liquide pour que 99 p. 100 d'acide cyanhydrique soient captés dans le ballon B. On pourra sans inconvénient distiller 40 à 70 p. 100 du contenu du ballon A.

Les aldéhydes et autres substances volatiles gênant le dosage peuvent être redistillés par la suite du ballon B vers le ballon A en inversant les ballons A et B, il suffit

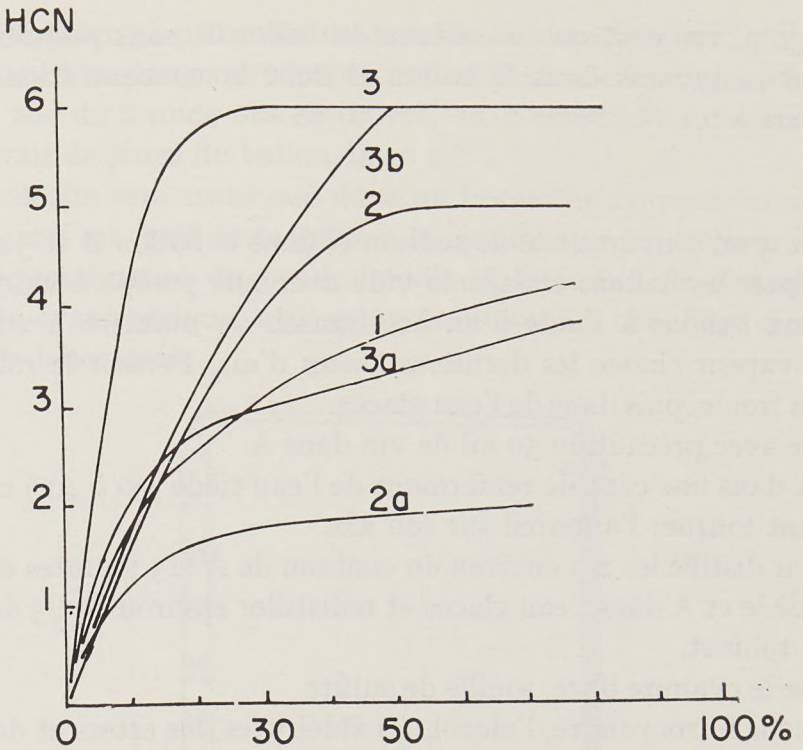


FIG. 3. — *Décomposition du ferrocyanure de potassium en milieu aqueux. Nombre de molécules de HCN libérées par une molécule de* $Fe(CN)_6K_4$ *en fonction du pourcentage de liquide distillé*

Courbe 1 : pH 3,7
Courbe 2 : pH 3,05 Courbe 2*a*, idem avec Cu^{++}
Courbe 3 : pH 0,65 Courbe 3*a*, idem avec Cu^{++} Courbe 3*b*, idem avec Cu^{+}

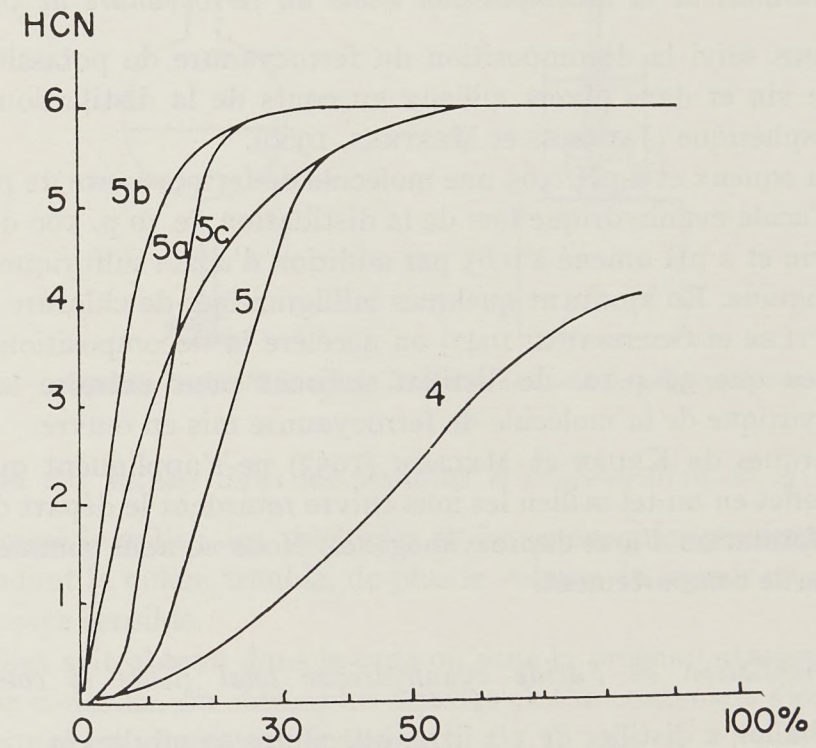


FIG. 4. — *Décomposition du ferrocyanure de potassium dans le vin*

Courbe 4 : vin seul : pH 3,2
Courbe 5 : vin porté à pH 0,95
Courbe 5*a* : idem avec Cu^{++}
Courbe 5*b* : idem avec Cu^{+}
Courbe 5*c* : essai à pH 0,95, réalisé avec du vin préalablement privé de son alcool par évaporation .

de redistiller 30 p. 100 environ du contenu du ballon B, sans préjudice pour les cyanures qui sont maintenus dans le ballon B dont la concentration en soude n'est jamais inférieure à 0,1 N.

Technique.

Introduire 4 ml d'hydroxyde de sodium N dans le ballon B et 5 ml d'eau dans le ballon A. Adapter les ballons et faire le vide avec une pompe à vide ; chauffer légèrement les deux ballons à l'aide d'un bec bunsen de manière à volatiliser un peu d'eau dont la vapeur chasse les dernières traces d'air. Fermer le robinet et plonger B dans de l'eau froide, puis dans de l'eau glacée.

Introduire avec précaution 50 ml de vin dans A.

Plonger A dans une capsule renfermant de l'eau tiède (30 à 40°) et aider la distillation en faisant tourner l'appareil sur son axe.

Après avoir distillé les 2/3 environ du contenu de A (15 minutes environ) plonger B dans l'eau tiède et A dans l'eau glacée et redistiller environ le 1/3 du contenu de B.

Ouvrir le robinet.

B renferme le cyanure libre, souillé de sulfite

A renferme le ferrocyanure, l'alcool, les aldéhydes, les esters et des combinaisons sulfitiques avec la vinasse.

2° Séparation de l'acide cyanhydrique total (HCN libre et HCN de l'ion ferrocyanogène)

a) *Conditions de la décomposition totale du ferrocyanure de potassium*

Nous avons suivi la décomposition du ferrocyanure de potassium en solution diluée dans le vin et dans divers milieux au cours de la distillation simple sous la pression atmosphérique (Jaulmes et Mestres, 1960).

En milieu aqueux et à pH 0,65 une molécule de ferrocyanure de potassium libère 6 molécules d'acide cyanhydrique lors de la distillation de 30 p. 100 du liquide.

Dans le vin et à pH amené à 0,65 par addition d'acide sulfurique il faut distiller 60 p. 100 du liquide. En ajoutant quelques milligrammes de chlorure cuivrique selon Hubach (Gettler et Goldbaum, 1947) on accélère la décomposition de l'ion ferrocyanure si bien que 30 p.100 de distillat suffisent pour extraire les 6 molécules d'acide cyanhydrique de la molécule de ferrocyanure mis en œuvre.

Les remarques de Kruse et Mellon (1953) ne s'appliquent qu'aux solutions aqueuses ; en effet en un tel milieu les ions cuivre retardent le départ de l'acide cyanhydrique par formation d'ions cuprocyanogènes. Nous ne nous sommes pas expliqué cette différence de comportement.

b) *Distillation de l'acide cyanhydrique total (libre et combiné)*

Dans un ballon à distiller de 1/2 litre, introduire 50 ml de vin, 1 mg environ de chlorure cuivrique et 5 ml d'acide sulfurique au 1/5.

Le distillat condensé par le réfrigérant est amené par un tube effilé dans un ballon jaugé de 40 ml renfermant 4 ml de solution N d'hydroxyde de sodium. Ce dernier récipient sera si possible immergé en partie dans de l'eau glacée.

Il suffit de distiller 30 p. 100 du contenu de la chaudière soit 16,5 ml, pour recueillir 6 molécules d'acide cyanhydrique par molécule de ferrocyanure, On distillera cependant 65 p. 100 du liquide mis en œuvre, en n'arrêtant la distillation qu'après avoir atteint le trait de jauge du ballon de 40 ml.

Le distillat alcalin sera transvasé dans un bécher et évaporé sur un bain-marie avec l'aide d'un jet d'air froid de manière à le réduire aux 2/3 environ de son volume initial. Les gaz de combustion du gaz de houille et la fumée de cigarette contenant des traces d'acide cyanhydrique, utiliser un bain-marie à chauffage électrique, et ne pas fumer dans le laboratoire.

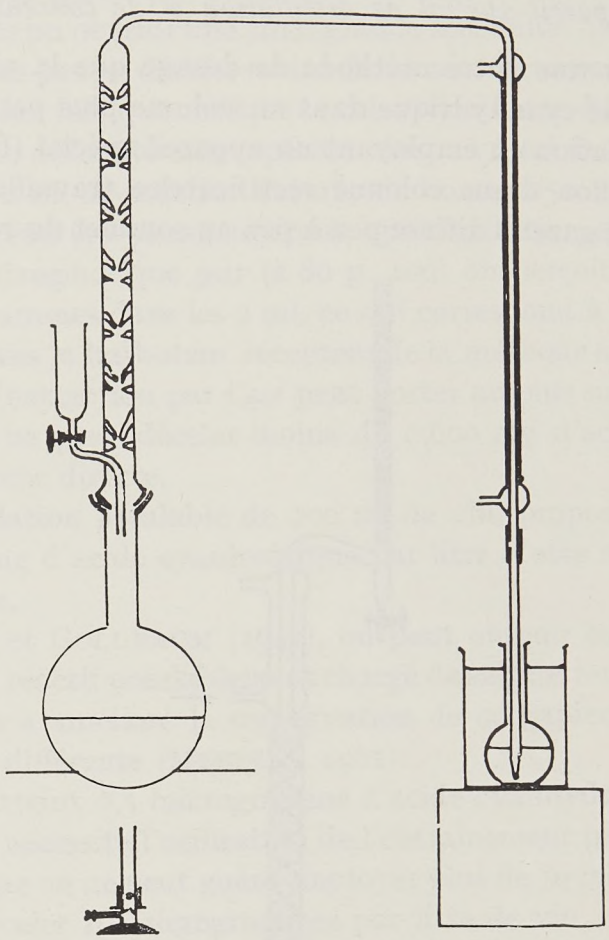


FIG. 5. — *Appareil de distillation pour le dosage de l'acide cyanhydrique total*

c) *Oxydation des sulfites dans les distillats et concentration de la solution*

On a débarrassé le milieu des aldéhydes et des esters qui gêneraient les réactions de dosage en rendant le milieu trouble, de plus le volume du liquide est réduit, ce qui permettra un dosage sensible.

Que le distillat soit obtenu dans le vide ou sous la pression atmosphérique suivant la technique ci-dessus, on obtient un distillat alcalin contenant l'ion cyanogène et l'ion sulfureux qui est généralement gênant.

Transvaser dans un ballon à distiller de 1/2 litre, rincer et refroidir en plongeant le ballon dans de l'eau froide.

Oxyder les sulfites par de l'iode N/20 en présence d'empois d'amidon après avoir acidulé le milieu par addition 6 ml d'acide sulfurique N. Détruire l'excès d'iode par

une goutte de thiosulfate 0,01 N et distiller aussitôt l'acide cyanhydrique en recevant le distillat dans un ballon de 40 ml renfermant 4 ml de soude N et plongé dans de l'eau glacée.

Distiller de manière à obtenir 28 ml environ de distillat alcalin (préparer à l'avance un trait de repère à 28 ml sur le ballon de 40 ml). Ce volume est prévu pour le dosage suivant la réaction d'EPSTEIN (voir plus bas).

Boucher et laisser reprendre au milieu la température ordinaire avant d'effectuer le dosage.

d) *Appareil spécial de distillation et de concentration*

En vue d'utiliser une autre méthode de dosage que la réaction d'EPSTEIN on peut concentrer l'acide cyanhydrique dans un volume plus petit de liquide au cours de cette ultime distillation en employant un appareil spécial (fig. 6).

On munit le ballon d'une colonne rectificatrice travaillant sous reflux total. L'acide cyanhydrique gazeux diffuse peu à peu au sommet du réfrigérant.

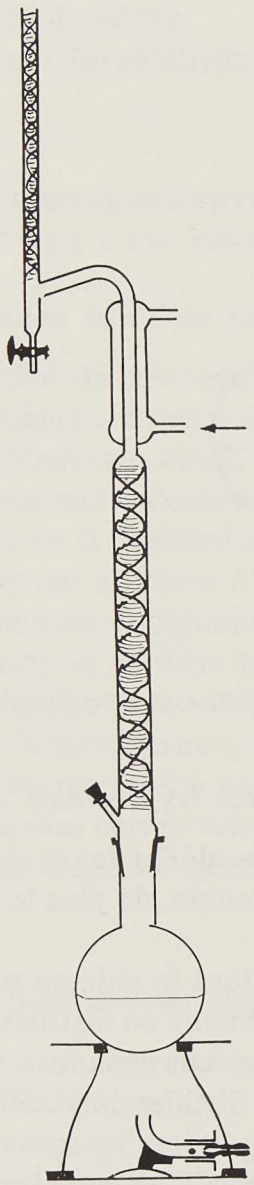


FIG. 6. — *Appareil de distillation et de concentration simultanées de l'acide cyanhydrique total. Le petit réfrigérant à reflux est alimenté avec de l'eau à 40°*

L'acide cyanhydrique est alors capté sur une hélice de toile plissée imprégnée de 5 ml de soude N placée à la sortie du réfrigérant alimenté avec de l'eau à 30°-40°. Ce procédé est efficace et général, mais il est un peu compliqué.

III. — MÉTHODES DE DOSAGE

1° Dosage par formation de bleu de prusse

Cette méthode est spécifique et Chelle et collab. (1935) l'ont bien étudiée. Pourtant nous n'avons pas pu obtenir une aussi grande sensibilité que celle indiquée par ces auteurs : nous n'avons pas pu déceler moins de 10 microgrammes dans 1 ml de solution aqueuse parce que l'ion ferrique masque la coloration bleue du ferrocyanure ferrique.

Pour éviter cette difficulté nous opérons ainsi : à 2 ml de solution cyanhydrique alcaline (N) ajouter 2 ml de solution saturée de borax, 250 mg d'acide borique, un cristal de sulfate ferreux (40-50 mg environ), après agitation et 15 mn de repos ajouter 0,3 ml d'acide phosphorique pur (à 80 p. 100) on perçoit ainsi la teinte bleue à partir de 12 microgrammes dans les 2 ml, ce qui correspond à 30 microgrammes dans les 5 ml contenus dans le barboteur récepteur de la méthode à entraînement par l'air.

Pratiquement l'extraction par l'air peut porter au plus sur 50 ml de vin (Chelle et coll., 1935) ; on ne peut déceler moins de 0,600 mg d'acide cyanhydrique par litre dans une recherche directe.

Avec une distillation préalable de 200 ml de vin, proposée par ces auteurs, on peut déceler 0,150 mg d'acide cyanhydrique par litre. Cette méthode est donc assez sensible et spécifique.

Avec Gettler et Goldbaum (1947), on peut obtenir la formation de bleu de Prusse sur un papier réactif préalablement chargé de sulfate ferreux et de soude caustique. L'un de nous a amélioré la conservation de ce papier par une technique de préparation un peu différente (Mestres, 1961).

La sensibilité atteint 0,5 microgramme d'acide cyanhydrique par tache.

Cette méthode nécessite l'utilisation de l'entraînement par l'air comme méthode de séparation. Comme on ne peut guère employer plus de 50 ml de vin pour cet entraînement, on peut déceler 10 microgrammes par litre de vin.

Elle est donc très sensible et spécifique, mais ses résultats peuvent être difficilement rendus quantitatifs.

2° Dosage par argentimétrie

Avec Chelle, Dubaquie et Turbet (1935) on peut doser les ions cyanogène par addition d'une suspension ammoniacale d'iodure d'argent N/10 000 en ions argent jusqu'à obtention d'un trouble stable.

Réactif :

Nitrate d'argent N/1000	10 ml
Ammoniaque	2 ml
Eau	5 ml
Iodure de potassium à 10 p. 100	5 gouttes

agiter et porter à 100 ml avec de l'eau :

1 ml = 0,005 4 mg HCN

Le volume employé doit être corrigé d'une quantité soustractive d'autant plus grande que le volume final est plus élevé, en moyenne égal au 1/10 de ce volume. Ce volume final ne doit pas dépasser 20 ml.

A ce procédé nous préférons employer la méthode de LIEBIG-DENIGES, technique SERRIES (1948) qui se termine par l'apparition d'un louche produit par l'addition de nitrate d'argent N/10 à N/10 000.

Pour que la méthode soit sensible, il faut qu'un trouble visible soit produit par un excès de solution argentique aussi faible que possible ; pour cela il faut opérer sur un volume de solution cyanée alcaline au plus égal à 5 ml. Ce volume est placé dans un tube à essai de 20 à 25 mm de diamètre, éclairé par un pinceau de lumière blanche intense, sur fond noir. On ajoute 2 ml de réactif de SERRIES (1948)

Iodure de potassium	6 g
Ammoniaque	10 ml
Eau q.s.p.	100 ml

Dans ces conditions on peut apercevoir le trouble produit par 1,5 ml de solution de nitrate d'argent N/10 000 ou 0,2 ml de solution de nitrate d'argent N/1 000, à condition que la *solution soit initialement absolument limpide*. On pourrait doser ainsi une quantité d'acide cyanhydrique égale ou supérieure à 8-10 microgrammes dans 5 ml, soit 0,100 mg dans un litre de vin, si on opère sur 100 ml de vin que l'on distille et dont on concentre le distillat à 5 ml comme nous l'avons indiqué plus haut et le rappelons plus bas. La condition de la limpidité parfaite du distillat est généralement difficile à réaliser dans le cas des vins, malgré l'évaporation partielle sur un bain-marie en milieu sodique. On peut y parvenir de trois manières :

1° Agitation du distillat désalcoolisé avec de la poudre grossière de paraffine et filtration (efficacité relative).

2° Après la première distillation, le distillat alcalin est redistillé au demi, on rejette ce distillat et on acidifie le résidu et continue la distillation en recevant le distillat sur de la soude normale (5 ml). On évapore sur le bain-marie jusqu'à 5 ml. Ce résidu est limpide.

3° L'emploi de l'appareil de rectification représenté par la fig. 6.

Nous avons essayé avec Mlle MANDROU (1961) la méthode de CHARPENTIER-VOLHARD en utilisant des solutions N/100 sur un distillat réduit à 10 ml.

En opérant par comparaison avec un essai à blanc, on peut apprécier le virage à une goutte près de thiocyanate N/100 qui correspond à 13,5 microgrammes, soit à peu près la même sensibilité que précédemment, mais l'opalescence du milieu ne gêne pas. Ce fait rend la méthode avantageuse, de plus à une molécule de cyanogène correspond un atome d'argent, soit deux fois plus que dans la méthode de LIEBIG. Malheureusement ce dosage ne peut pas être fait en milieu contenant plus de 0,05 ml d'acide nitrique pour 15 ml, et alors il est exposé aux erreurs dues à la présence éventuelle d'ions volatils précipitant l'argent en milieu très peu acide.

La méthode officielle allemande de dosage de l'acide cyanhydrique dans les vins est basée sur ce principe. Elle comporte l'entraînement de l'acide cyanhydrique par un courant de gaz carbonique en même temps que l'on fait bouillir le vin et la purification du distillat par barbotage dans une solution chaude de carbonate monosodique, puis une solution tiède de chlorure mercurique. Ce procédé est relativement compliqué tout en étant d'une sensibilité limitée à 0,13 mg/litre à partir de 300 ml de vin.

3° Dosage par la ferroïne

A. A. Schilt a indiqué en 1958 une nouvelle méthode de dosage colorimétrique de l'ion cyanogène basée sur la formation et l'extraction par le chloroforme du complexe dicyano bis 1-10 phénanthroline ferreuse (de coloration violette) produit par la réaction des cyanures libres sur la tri 1-10 phénanthroline ferreuse ou « ferroïne ».

Essais directs sur le vin.

Le ferrocyanure ne réagissant pas, cette méthode pourrait être employée pour réaliser *directement* le dosage des cyanures libres dans le vin, mais l'expérience montre d'une part que l'on ne peut pas déceler moins de 20 microgrammes d'acide cyanhydrique en utilisant 50 ml de vin et d'autre part que l'extraction par le chloroforme n'est plus praticable sur un plus grand volume de vin à cause des précipitations provoquées par l'addition de soude et de phosphates.

La sensibilité est donc limitée à 400 microgrammes d'acide cyanhydrique par litre de vin.

Dosage après distillation.

L'obligation d'effectuer une extraction chloroformique ne rendra cette technique intéressante que si elle peut être appliquée au premier distillat issu du vin.

Nous avons pu doser avec précision l'acide cyanhydrique introduit sous forme de ferrocyanure de potassium en opérant sur 200 ml de vin renfermant de 16 à 200 microgrammes d'acide cyanhydrique dans l'essai. Tous les essais avec 10 microgrammes ont été infructueux.

La sensibilité est donc supérieure sur les distillats, mais elle ne s'abaisse pas au-dessous de 80 microgrammes par litre.

La technique opératoire est la suivante :

Aux 60 ml de distillat obtenu à partir de 100 ml de vin et reçus dans 5 ml de soude *N* et 5 ml de phosphate disodique M (358 g/l), on ajoute 1 ml d'hydroxylamine à 10 p. 100 et on ajuste à pH 9.

On introduit 5 ml de ferroïne et on porte 15 mn sur un bain-marie bouillant. Après refroidissement on extrait en ampoule à décantation par 5 ml de chloroforme à trois reprises.

Les trois fractions chloroformiques sont reçues dans une éprouvette, on porte à 15 ml et on examine la densité optique à 597 millimicrons par rapport à du chloroforme.

Réactif ferroïne	Sulfate de fer et d'ammoniaque	1,96 g
	Phénanthroline monohydratée	2,17 g
	Eau....q.s.p.	1 l

Remarque importante.

La technique de séparation par distillation sous la pression ordinaire sans évaporation consécutive entraîne d'ailleurs le risque d'erreur dû au furfural et à ses dérivés. En effet si l'on pyrogène même légèrement les matières extractives, le furfural formé réagit avec la ferroïne pour donner une coloration violette intense et ce corps serait compté comme acide cyanhydrique.

4° Dosage a l'état d'isopurpurate

L'acide picrique se combine à l'ion cyanogène en milieu alcalin en donnant un ion isopurpurique rouge. Dès 1859, Hlasiwetz et Waller ont indiqué cette réaction et Guignard (1906) l'a fait connaître par son papier picrosodique. R. G. Smith (1929) a plus récemment proposé une technique qu'avec C. Henry (1957), nous avons améliorée.

On doit préparer trois solutions : solution saturée de carbonate acide de sodium, solution saturée de carbonate neutre de sodium et solution sursaturée de picrate de de sodium. Pour préparer cette dernière solution on dissout 10 g d'acide picrique dans 130-140 ml d'eau, on y ajoute 1,70 g de soude dissous dans 50 ml d'eau, on agite et ajoute de la soude N jusqu'à ce qu'une goutte de cette solution rougisse nettement la phénolphtaléine en touche externe. On porte à 200 ml la solution que l'on conserve dans un flacon en pyrex de 250 ml, ce qui permet de la chauffer au bain-marie avant l'emploi, si elle est prise en masse.

Technique :

Dans un tube à essai placer :

Solution de cyanure à doser	5 ml
Solution de carbonate acide de sodium	1 ml
Solution de picrate	1 ml
Solution de carbonate neutre de sodium	2 gouttes

On place le tube dans un bain-marie bouillant durant 5 mn. Après refroidissement, on compare à une gamme semblablement obtenue avec 2 à 100 microgrammes d'acide cyanhydrique. L'erreur absolue atteint 1 microgramme pour les plus petites doses, l'erreur relative se maintient à 10 p. 100 entre 10 et 100 microgrammes.

On peut faire la comparaison avec un photocolorimètre à 488 millimicrons. Il faut seulement utiliser un réactif picrique un peu moins concentré (dilué à 65 p. 100) pour qu'il soit toujours liquide et de concentration fixe.

Avec un photocolorimètre à écrans, on doit travailler entre 8 et 30 microgrammes dans les 5 ml avec une cuve de 1 cm d'épaisseur et l'écran n° 49 (490 mμ).

Avec un spectrophotomètre à monochromateur, on opérera à 488 millimicrons entre 5 et 70 microgrammes dans 5 ml.

Cette réaction étant troublée par l'éthanal et l'anhydride sulfureux, il est nécessaire de débarrasser le distillat de ces substances par double distillation comme il est indiqué plus haut. Malgré cette complication, cette méthode à l'isopurpurate est intéressante par sa sensibilité ; elle permet de doser de 0,020 à 0,500 mg d'acide cyanhydrique par litre en partant de 100 ml de vin. Mais l'appréciation de la coloration orangée — même comparativement à la solution jaune du réactif, laisse l'esprit insatisfait *pour les petites doses*, car ces couleurs sont voisines.

5° Méthode fluorescimétrique

Hanker et collab. (1957) ont basé une méthode sur le fait que la chloramine T transforme l'ion cyanogène en chlorure de cyanogène qui réagit sur l'amide nicotinique en ouvrant le cycle pyridinique et en donnant un composé doué d'une fluorescence bleue.

On peut déceler 0,4 microgramme d'acide cyanhydrique. Ce dosage est troublé par l'éthanol, mais non par l'éthanal et l'ion sulfureux.

Nous n'avons pas retenu ce procédé, car les dosages précis par la fluorescence ne sont pas facile à réaliser.

6° Méthodes a la phénolphtaline et a la résine de gaïac

Deux autres méthodes sont employées pour le dosage de l'acide cyanhydrique : elles sont basées sur la libération d'oxygène par action des cyanures sur l'ion cuivrique. Cet oxygène naissant est caractérisé par l'oxydation de la phénolphtaline alcaline qui devient rose, l'oxydation de la résine de Gaïac avec formation d'une coloration bleue (voir l'annexe à notre mémoire (Jaulmes et Mestres, 1960) sur les techniques de ces méthodes).

Nous avons pas utilisé ces réactions malgré leur intérêt, car nous avons préféré des réactions plus spécifiques.

7° Méthodes d'Epstein

La réaction du bromure de cyanogène sur la pyridine, réaction dont le mécanisme a été étudié par König dès 1904 (König, 1904 ; König et Becker, 1912), a servi de base à différentes méthodes de dosage d'acide cyanhydrique dans lesquelles on transforme les cyanures à doser soit en bromure de cyanogène au moyen de l'eau de brome (Aldridge ; Murty et *al.*, 1961), Asmus et *al.*, 1953), soit en chlorure de cyanogène au moyen de la chloramine T (Epstein, 1947 ; Hanker et *al.*, 1957).

Le bromure ou le chlorure de cyanogène réagissant sur la pyridine forme du bromure ou du chlorure de cyanopyridinium qui est hydrolisé en aldéhyde glutaconique capable de se copuler avec divers réactifs : benzidine (Aldridge), acide barbiturique (Asmus et *al.*, Murty et *al.*), pyrazolone (Epstein) ou nicotinamide (Hanker et *al.*) pour donner des colorations ou une fluorescence intense.

Après Kruse et Mellon (1953), nous avons examiné les possibilités de la technique d'Epstein et adapté cette méthode au dosage de l'acide cyanhydrique dans les vins (Jaulmes et Mestres, 1960 ; Mestres, 1961) après avoir modifié le réactif et la technique originale afin d'améliorer la stabilité de la coloration obtenue (Jaulmes et Mestres, 1960 ; Mestres et Fodda, 1960).

Cette méthode permet de doser de 0,1 *à* 15 *microgrammes de HCN dans un volume de* 40 *ml par colorimétrie à* 625 *millimicrons*. Elle permettra donc de déterminer des teneurs en acide cyanhydrique total comprises entre 2 et 300 microgrammes de HCN par litre en utilisant 50 ml de vin et de 20 à 3 000 microgrammes de HCN par litre en utilisant 5 ml de vin.

Un moyen commode de vérifier la technique consiste à doser simultanément sur deux parties aliquotes du dernier distillat amené à 40 ml, soit 25 et 10 ml de ce distillat.

Dans cette éventualité les limites précédentes deviennent respectivement :

3,2 microgrammes à 0,48 milligramme avec 50 ml de vin et un dosage sur 25 ml de distillat.

32 microgrammes à 4,8 milligrammes avec 5 ml de vin et un dosage sur 25 ml de distillat.

8 microgrammes à 1,2 milligrammes avec 50 ml de vin et un dosage sur 10 ml de distillat.

80 microgrammes à 12 milligrammes avec 5 ml de vin et un dosage sur 10 ml de distillat

Un premier dosage peut permettre de choisir la technique à adopter, nous conseillerons de prendre en premier lieu :

50 ml de vin et de doser sur les parties aliquotes de 25 et 10 ml si le vin est limpide

ou 5 ml seulement si le vin est trouble ou s'il présente un dépôt bleu visible.

Extraction de l'acide cyanhydrique.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, la libération de six molécules d'acide cyanhydrique par molécule de ferrocyanure exige des conditions différentes selon que l'on se place en milieu aqueux ou dans le vin. L'addition de chlorure de cuivre utile dans le vin devient néfaste en milieu dilué.

D'où les deux protocoles suivants :

Dans l'appareil à distillation précédemment décrit (fig. 5), introduire :

Prise d'essai de vin	50 ml	ou	5 ml
Eau distillée	0		45 ml
Chlorure de cuivre crist. environ	10 mg		0
Acide sulfurique au 1/5 en volume	5 ml		5 ml

Le ballon étant surmonté d'une petite colonne de Vigreux de 25 cm de hauteur, distiller lentement, au début, rapidement par la suite en recevant le distillat condensé dans un ballon jaugé de 40 ml par la voie d'un tube effilé prolongeant le réfrigérant.

Dans les deux cas, le ballon récepteur de 40 ml aura été garni avec 4 ml de solution normale de soude.

Distiller jusqu'à obtention de 40 ml au total.

Transvaser dans un bécher de 250 ml, rincer le ballon avec 3 ml d'eau distillée.

Noter avec un crayon gras — ou tout autre moyen — le niveau du liquide dans le bécher.

Porter sur un bain-marie bouillant, diriger un jet d'air froid (obtenu à l'aide d'un sèche-cheveux en position : air froid) vers l'intérieur du bécher, laisser évaporer jusqu'à réduction à : 28-30 ml ou 40 ml environ suivant que l'on a utilisé au départ 50 ou 5 ml de vin.

L'évaporation se fait en moins de 15 et 6 mn respectivement.

Transvaser le contenu du bécher dans un ballon à distiller de 500 ml identique au premier, rincer avec 3 ml d'eau distillée, laisser refroidir en plongeant le ballon quelques instants dans de l'eau glacée.

Ajouter une petite dose d'empois d'amidon sensible et 6 à 7 ml de solution normale d'acide sulfurique. Oxyder l'anhydride sulfureux rapidement par de l'iode N/10 jusqu'à virage au bleu, décolorer par une ou quelques gouttes de thiosulfate N/5 et adapter aussitôt sous la colonne de Vigreux.

Distiller, lentement au début, rapidement par la suite, en recevant le distillat dans un ballon de 40 ml renfermant 4 ml de soude N.

Distiller, soit jusqu'à 28 ml exactement, soit jusqu'à 30-35 ml environ selon que l'on désirera doser sur la totalité ou sur une partie aliquote du distillat. Dans ce dernier cas, ajuster 40 ml avec de l'eau distillée et mélanger.

Dosage.

On effectuera le dosage colorimétrique :

— soit sur la totalité de la prise d'essai : dernier distillat de 28 ml,
— soit sur des parties aliquotes (25 et 10 ml) du distillat amené à 40 ml.

Selon le cas choisi on introduira dans le ballon de 40 ml, en mélangeant après chaque addition.

Méthode	Sur totalité	Sur des parties aliquotes	
Distillat	totalité (28 ml)	25 ml	10 ml
Solution tampon	2 ml	5 ml	5 ml
Solution d'acide phosphorique 1,5 N	3 ml	1,9 ml	0,75 ml
Vérifier au papier pH que l'on a bien pH 7,5 — ajuster si nécessaire			
Chloramine T à 1 p 100	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
	Repos 1 minute 30 secondes		

Ajouter 6 ml de réactif pyridine-pyrazolone, mélanger, ajuster à 40 ml avec de l'eau distillée, mélanger.

Mesurer la densité optique après 45 mn à 1 h à 625 mμ par rapport à une solution témoin, ou par rapport à de l'eau distillée à laquelle l'on attribuera une absorption égale à (— 0,01) dans des cuves de 1 cm d'épaisseur.

La quantité d'acide cyanhydrique contenue dans la prise d'essai du dosage colorimétrique est égale à :

$q = 10{,}5\ D$ (relation que l'on vérifiera avec l'appareil utilisé),
q en microgrammes,
D en unités de Densité Optique.

Remarque. — Le dosage de l'acide cyanhydrique libre pourra évidemment être effectué par cette méthode.

Après distillation sous vide, dans les deux sens avec l'appareil spécial décrit plus haut, le contenu du ballon récepteur sera acidulé par 6 à 7 ml de solution normale d'acide sulfurique et oxydé par l'iode avant la deuxième distillation sous la pression normale qui fournira le distillat servant au dosage colorimétrique.

Réactifs.

— Chloramine T à 1 p. 100 dans l'eau distillée.
— Tampon pH 7,5

Phosphate monopotassique	94 g
Hydroxyde de sodium en solution normale	565 ml
Eau distillée q. s. p.	1 000 ml

— Acide phosphorique 0,75 M obtenu par dilution à 1/18 d'acide phosphorique 60° Bé, d = 1,71 et ajustage à 1,5 N par titrage avec soude N en présence de phénolphtaleine.
— Bis (1 phényl 3 méthyl 5 pyrazolone) à préparer comme l'indique EPSTEIN : Dissoudre 71,4 g de 1 phényl 3 méthyl 5 pyrazolone dans 100 ml d'alcool à 95°, ajouter 25 g de phénylhydrazine fraîchement distillée, porter à l'ébullition sous reflux pendant 4 h. Le mélange est filtré chaud et le précipité lavé plusieurs fois avec de l'alcool à 95° (P. F. 320°C).

L'ébullition sous reflux pourra être prolongée au-delà de 4 h si l'apparition de cristaux jaunes est peu abondante après ce temps.

Réactif. — Dans un ballon de 100 ml introduire 0,150 g de 1 phényl 3 méthyl 5 pyrazolone et les dissoudre dans 50 ml d'alcool à 95° distillé sur potasse, compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

D'autre part, peser 20 mg de bis (1 phényl 3 méthyl 5 pyrazolone) et les dissoudre par agitation prolongée dans 20 ml de pyridine.

Mélanger les deux solutions ainsi obtenues en les versant dans un flacon en verre jaune enveloppé d'un papier noir.

Conserver au réfrigérateur.

En résumé la réaction d'EPSTEIN, étant extrêmement sensible et spécifique, permet de déceler et de doser de très faibles traces d'acide cyanhydrique. Si on utilise 50 ml de vin, on peut ainsi doser de 0,002 à 0,300 mg d'acide cyanhydrique par litre de vin. Cette méthode convient bien à la recherche des résidus d'un « collage bleu » ou des composés cyanogénétiques naturels de la levure alcoolique.

Grâce à cette sensibilité, on peut même doser l'acide cyanhydrique à partir de 5 ml de vin seulement, si sa quantité est comprise entre 0,020 et 3 mg/l. C'est cette méthode qui nous a paru la plus recommandable pour ce dosage. La connaissance des autres procédés de dosage reste utile ne serait-ce que pour contrôler éventuellement les données de la réaction d'EPSTEIN.

IV. — RÉSULTATS OBTENUS

A la demande de la Commission réunie par le Service de la Répression des Fraudes l'un de nous (MESTRES, 1961) a, avec l'aide de M. FODDA (FODDA, 1960), examiné en 1960 un certain nombre de vins traités au ferrocyanure de potassium dans des conditions diverses, et ces mêmes vins avant tout traitement.

La teneur de ces échantillons en acide cyanhydrique libre, combiné et total a été mesurée en appliquant les techniques indiquées plus haut, et principalement la méthode d'EPSTEIN.

1° ÉTUDE DE VINS TRAITÉS PAR LE FERROCYANURE DE POTASSIUM

Avec les vins convenablement traités au ferrocyanure, ne présentant aucun dépôt bleu, vins dont la teneur en fer avait été ramenée de 15-20 mg à 3-7 mg par litre, il a été obtenu :

Acide cyanhydrique libre inférieur à 2 microgrammes par litre dans 35 échantillons,
Acide cyanhydrique libre compris entre 3 et 4 microgrammes par litre dans 12 échantillons,

Acide cyanhydrique total inférieur à 2 microgrammes par litre dans 31 échantillons,
Acide cyanhydrique total 3 à 10 microgrammes par litre dans 31 échantillons,
Acide cyanhydrique total 30 à 50 microgrammes par litre dans 3 échantillons.

Trois vins mal collés après traitement présentaient un précipité bleu, ils contenaient 15, 50, et 6 microgrammes d'acide cyanhydrique libre par litre, et 550, 620 et 95 microgrammes d'acide cyanhydrique total par litre.

Des essais effectués sur d'autres vins où subsistait un dépôt bleu ont montré

que la teneur en acide cyanhydrique libre était comprise entre 30 et 50 microgrammes par litre tandis que la teneur de ces vins en acide cyanhydrique total s'élevait de 0,3 à 20 mg/l selon la durée du repos avant le prélèvement.

2° Étude de vins non traités

Avec les vins non traités au ferrocyanure, il a été constaté que 10 vins sur 17 vins blancs doux ou secs ont libéré — dans les conditions du dosage — de l'acide cyanhydrique en quantité appréciable. En général les vins rouges limpides ne donnent pas de réaction positive, c'est-à-dire que leur teneur est inférieure à 5 microgrammes par litre.

L'entraînement de l'acide cyanhydrique libre par barbotage d'air a permis d'extraire des 10 vins blancs précités jusqu'à 140 microgrammes d'acide cyanhydrique par litre, tandis que la distillation sous vide ne libérait que 2 à 6 microgrammes d'acide cyanhydrique libre et la distillation sous la pression normale et en milieu acide permettait d'extraire jusqu'à 230 microgrammes d'acide cyanhydrique total, la moyenne de l'acide cyanhydrique total de ces 10 vins s'établissant à 83 microgrammes par litre.

Très frappés par ces résultats obtenus par la réaction d'Epstein, nous avons contrôlé sa spécificité en vérifiant que 35 composés autres que les 11 composés chimiques essayées par Epstein ne donnaient pas cette réaction.

Nous n'avons cependant conclu à la certitude de la présence d'acide cyanhydrique dans ces vins que parce qu'il nous a été possible de l'identifier par d'autres réactions : la formation de bleu de Prusse, selon Chelle et coll., Gettler et Goldbaum, la réaction picrosodique, la cyanoargentimétrie, la réaction à la ferroïne (Mestres 1961).

L'origine de cet acide cyanhydrique décelé par les opérations de dosage a été recherchée.

A une exception près, la teneur de ces vins en fer était normale (15 à 23 mg par litre), mais tous les vins étaient troubles, l'examen du dépôt montrant l'existence de très abondantes levures alcooliques.

La recherche et le dosage de l'acide cyanhydrique dans le dépôt d'un litre de vin a montré qu'il était susceptible de libérer dans les conditions habituelles de distillation (voir 2°, b) jusqu'à 300 microgrammes d'acide cyanhydrique total.

3° Présence d'acide cyanhydrique dans les levures alcooliques, les lies, etc.

Cette constatation a amené l'un de nous à contrôler le comportement d'une suspension de *levure de boulangerie*. Leur distillation entraîne toujours le départ immédiat d'une trace (0,1 à 0,5 microgrammes pour 1 g de levure sèche) d'acide cyanhydrique, tandis que leur calcination entraîne, même en milieu acide, le départ de quantités importantes d'acide cyanhydrique (jusqu'à 300 microgrammes pour 1 g de levure sèche). Leur putréfaction n'engendre pas d'acide cyanhydrique.

La distillation des lies de vin rouge riches en levures alcooliques, conduit aux mêmes constatations : 10 à 60 microgrammes d'acide cyanhydrique pouvant être extraits par litre de lies dans la tête du distillat.

La possibilité de libération, par distillation d'acide cyanhydrique paraît donc liée à la présence du ferment alcoolique.

Bien plus, en vinifiant en bouteille et en bonbonne du jus de raisin ensemencé avec des levures utilisées en œnologie, nous avons décelé des traces d'acide cyanhydrique (10 microgrammes) dans le gaz carbonique dégagé au début de la fermentation d'un litre de jus pendant 10 heures seulement.

V. — RECHERCHE D'UN TRAITEMENT ILLICITE PAR LE FERROCYANURE ET CONTRÔLE DES VINS

1° Estimation de la limite maxima de l'acide cyanhydrique total naturel

En conséquence l'existence de traces d'acide cyanhydrique d'origine naturelle — à l'état combiné ou libre — nous paraît prouvée ; elle complique sérieusement l'interprétation du résultat du dosage de l'acide cyanhydrique des vins, car on ne peut plus déduire de la présence de traces notables d'acide cyanhydrique que le vin a été traité au ferrocyanure plus ou moins habilement.

Est-il possible de fixer une limite maxima pour les vins à déclarer propres à la consommation ? Il nous paraissait rationnel de fixer cette limite à 50 microgrammes d'acide cyanhydrique total par litre. Mais cette dose est manifestement trop faible pour les vins non dépouillés.

Pourrait-on la fixer à 150-200 ou 250 microgrammes pour de tels vins sans inconvénients pour la santé publique ?

Remarquons que nous avons trouvé dans la pulpe des fruits suivants des quantités notables d'acide cyanhydrique total (en 1961).

Abricots	3	microgrammes par kilogramme de fruits (noyaux enlevés)
Pêches	18	
Cerises	86	

Personne ne met en doute l'inocuité de ces fruits et leur valeur alimentaire.

Il est d'ailleurs bien connu que l'acide cyanhydrique ne donne pas d'intoxication chronique, l'élimination de petites doses de ce corps étant rapide et complète.

Même la dose de 250 microgrammes d'acide cyanhydrique *libre* par litre serait acceptable au point de vue de la santé publique, car il faudrait absorber 250 l d'un tel vin en moins d'une heure pour ingérer une dose mortelle d'acide cyanhydrique.

Le coefficient de sécurité serait donc très large et cette limite paraît acceptable. D'ailleurs si cette quantité d'acide cyanhydrique était due à un excès de ferrocyanure, le vin présenterait une couleur ou un dépôt bleu — le consommateur serait averti.

Mais il faut avoir un test objectif pour déceler tout excès de ferrocyanure dans le vin et rejeter de la consommation tout vin contenant un excès même minime de ferrocyanure ou du ferrocynaure ferrique non précipité, car indépendamment de toute question de nocivité, la présence d'un dépôt bleu est absolument à éviter.

Pour arriver à ce résultat, nous avons proposé à la Commission de la Répression des Fraudes et à la Sous-Commission pour l'unification des méthodes d'analyse des vins de l'Office international de la Vigne et du Vin trois essais tests très faciles à mettre en œuvre. Voici la technique de ces essais, tel qu'elle a été adoptée après modifications par ces Commissions :

2° Contrôle des vins traités par le ferrocyanure de potassium

a) *Recherche des traces de ferrocyanure en suspension*

Après agitation de l'échantillon, on place 20 ml de vin dans un tube à centrifuger conique, de 30 ml. On centrifuge 15 mn à 3 000/3 500 tours/minutes. Le culot de centrifugation doit être totalement exempt de particules bleues.

b) *Recherche de traces de ferrocyanure dissous*

Dans un tube à centrifuger conique de 30 ml, on place 20 ml de vin limpide, 1 ml d'acide chlorhydrique au 1/2 en volume et une goutte d'une solution d'alun de fer et d'ammoniaque à 15 p. 100. Après agitation et repos d'au moins 24 heures, on centrifuge un quart d'heure à 3 000-3 500 tours/minutes. Le culot de centrifugation doit être totalement exempt de particules bleues de ferrocyanure ferrique.

c) *Vérification de la présence de fer libre dans le vin*

Dans un tube à essai on place 20 ml de vin, 1 ml d'acide chlorhydrique exempt de fer dilué au 1/2 en volume, (1) une goutte d'une solution de ferrocyanure de potassium à 10 p. 100 et une goutte d'une solution de ferricyanure à 10 p. 100 de préparation très récente. Une coloration ou un précipité de couleur bleue doit apparaître en moins de 30 minutes. En filtrant sur filtre sans plis, de 50 mn de diamètre et en rinçant ce filtre deux fois avec 5 ml d'eau, on doit observer un dépôt bleu sur ce papier.

Remarquons que les essais *a* et *b* sont positifs à partir de 1 mg de ferrocyanure de potassium par litre de vin, soit 0,45 mg d'acide cyanhydrique total par litre.

Ces tests sont très simples, rapides et à la portée de tous les œnologues et ils ne nécessitent pas d'appareils compliqués. Ils pourraient suffire à eux seuls.

3° Choix des méthodes de dosage

Pour plus de sûreté il faut savoir vérifier si la quantité d'acide cyanhydrique est inférieure — dans tous les cas — à la limite que nous proposons de 0,25 mg d'acide cyanhydrique total par litre de vin. Pour ces essais divers procédés sont utilisables.

La méthode de Chelle-Dubaquie et Turbet (1935) permet de vérifier l'absence d'acide cyanhydrique totale à dose dépassant 0,15 mg par litte.

Pour les recherches et les contrôles officiels, le procédé argentimétrique de dosage de l'acide cyanhydrique total extrait du vin acidulé par distillation sous la pression normale, à partir de 100 ml de vin, est suffisant. Il est spécifique, assez simple et il est capable de déceler et de doser toute quantité d'acide cyanhydrique total supérieure à 0,100 mg par litre. Il assure ainsi l'élimination de tout vin contenant un excès de ferrocyanure en ne retenant comme impropre à la consommation que les vins qui contiennent plus de 0,25 mg d'acide cyanhydrique total par litre.

(1) *Préparation de HCl exempt de fer.*
Diluer de l'acide chlorhydrique pur du commerce avec son volume d'eau et distiller.

Ce n'est que pour la recherche de traces d'acide cyanhydrique naturel ou accidentel que les techniques les plus sensibles sont nécessaires. Celles basées sur la réaction d'Epstein permettent de résoudre assez facilement ce problème.

Recu pour publication en mai 1962.

SUMMARY

THE DETERMINATION OF HYDROCYANIC ACID IN WINE

The authors have studied the conditions of distillation of free and of total hydrocyanic acid from ferrocyanide which may be present in wine as the result of improper treatment.

They have compared and measured the sensitiveness, the advantages and the deficiencies of six methods for the estimation of traces of hydrocyanic acid and they have given details of those they consider to be the most practicable, or the most sensitive, for employment at the concentrations studied.

As the result of their work, they have found hydrocyanic acid in alcohol yeast, in the lees and in non-sedimented wine, but in quantities always less than 0,25 mg per litre of wine.

Practical methods of control are indicated.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Asmus E., Garsenagen H., 1953. — Über die Verwendung der barbitursäure für die photometrische Bestimmung von Cyanid und Rhodonid. *Z. anal. Chem.*, **138**, 414.

Chelle L., Dubaquie J., Turbet H., 1935. — Étude toxicologique sur le collage bleu. *Bull. Trav. Soc. Pharm. Bordeaux*, fasc. I, 9.

Conway E. J., 1950. — Microdiffusions analysis and volumetric error, p. 7. Crosby Lockwood and Son LTD, London.

Epstein J., 1947. — Estimation of microquantities of cyanide. *Anal. Chem.*, **19**, 272.

Fodda M. A., 1960. Travail au laboratoire de Chimie analytique et Toxicologie. Faculté de Pharmacie de Montpellier. *Inédit.*

Gettler A. O., Goldbaum L., 1947. Détection and estimation of microquantities of cyanide. *Anal. Chem.*, **19**, 270.

Guignard L., 1906. *Bull. Sciences Pharmacologiques*. **5**, 415.

Hanker J. S., Gamson R. M., Klapper H., 1957. Fluometric method for estimation of cyanide. *Anal. Chem.*, **29**, 879.

Henry Cl., 1957. Dosage de l'acide cyanhydrique dans le vin. *Thèse Doctorat Pharmacie*, Montpellier.

Hlasiwets, Waller, 1859. Über eine neue Zersetzungsweise der trinitrophenylsäure. *Liebigs Ann. der Chimie*, **110**, 289.

Jaulmes P., Mestres R., Henry Cl., 1958. Dosage et microdosage de l'acide cyanhydrique dans les vins et autres liquides. *Bull. Soc. Chim.*, 147.

Jaulmes P., Mestres R., 1960. Recherche et dosage de l'acide cyanhydrique dans les vins traités au ferrocyanure. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **621/622**, 455-475.

König W., 1904. Untersuchungen dem organischen Laboratorium der technischen Hochschule zu Dresden. LXIX. — Über eine vom Pyridin derivierende Klasse vom Farbstoffen. *J. pratik. Chem.*, **69**, 105.

Konig W., Becker G. A.,1912. — *Ibidem*, XCIX. Uber den Zusammenhang swischen Farbe und Konstitution der pyridinfarbstoffe aus sekundären aromatischen Aminen, **85**, 353.

Kruse J. M., Mellon M. G., 1953. Colorimetric determination of cyanide and thiocyanate. *Anal. Chem.*, **25**, 446.

Mandrou B., 1961. — Travail au laboratoire de chimie analytique et Toxicologie. Faculté de Pharmacie de Montpellier. *Inédit.*

Mestres R., Fodda M. A., 1960. — Adaptation de la réaction d'Epstein au dosage des cyanures extraits des vins traités au ferrocyanure de potassium. *Bull. Soc. Chim.*, 1038.

Mestres R., 1961. — Note sur la recherche du traitement des vins en ferrocyanure de potassium. Extraction d'acide cyanhydrique à partir des vins normaux. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **630**, 281-298.

Murty G. V. L. N., Viswanathan 1961. — Détermination of traces of cyanide. *Anal. Chim. Acta*, **25**, 293-

SCHILT A. A.,1957. — The cyanide 1-10 phenanthroline complexes of iron II. *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 5421.

SCHILT A. A., 1958. — Colorimetric determination of Cyanide. Tri (1-10-phenanthroline) Iron (II) as a selective and sensitive reagent. *Anal. Chem.*, **30**, 1409.

SERRIES N., 1948. — Le dosage de l'ion cyanogène par la méthode argentimétrique de Denigès. *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, **8**, 7.1

SIDELNIK N., 1958. — Travail au laboratoire de chimie analytique et Toxicologie, Faculté de Pharmacie de Montpellier. *Inédit.*

SMITH R. G., 1929. — A method for the quantitative determination of cyanide in small amounts. *J. Amer., Chem. Soc.*, **51**, 1171.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (4), 271-273

SUR L'ORIGINE DE L'HYDROXYMÉTHYLFURFURAL DE CERTAINS JUS DE RAISINS

M. FLANZY et Yvonne COLLON

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude).

SOMMAIRE

Dans un mémoire précédent, les auteurs ont mis en évidence la présence d'hydroxyméthylfurfural dans certains jus de raisin.

Au cours de ce travail, ils recherchent les causes possibles de formation de ce constituant indésirable des jus. Ils précisent ainsi une origine technologique : durée et température de chauffage.

Ils recherchent enfin les possibilités d'origine physiologique de ce constituant en étudiant huit cépages en cours de maturation ou de surmaturation.

INTRODUCTION

Au cours d'un travail précédent (COLLON, 1962), on a noté deux origines de l'hydroxyméthylfurfural trouvé dans certains jus de fruits : réaction de MAILLARD et dégradation thermique des sucres. Il a paru intéressant de préciser l'influence de la durée et de la température de chauffage sur sa formation. Certains industriels et même certains biochimistes ont pensé que ce constituant préexistait dans les jus provenant de raisins surmûris (passerillés). Aussi les auteurs ont-ils eu le souci de vérifier cette hypothèse.

MÉTHODES UTILISÉES

1° Dans le but de préciser le seuil d'apparition de l'hydroxyméthylfurfural au cours du chauffage des jus de raisin, on a procédé aux essais suivants :

Pour six séries de six tubes à essai, on a introduit dans chaque tube 10 ml de jus de raisin blanc ayant un taux de 158 g de sucre par litre et une acidité titrable de 4,4 g exprimée en acide sulfurique par litre, exempt de toute trace d'hydroxyméthylfurfural décelable par la méthode colorimétrique de WINKLER (WINKLER, 1955).

Chaque série de six tubes a été chauffée pendant trente minutes au bain-marie à température constante (± 1°C près), respectivement à 70, 75, 80, 85, 90, 95°C.

Pour chaque série, un tube était retiré de cinq en cinq minutes, et refroidi immédiatement sous l'eau courante, de façon à l'amener rapidement à température ambiante.

L'hydroxyméthylfurfural a été ensuite dosé dans tous les échantillons par la méthode colorimétrique de WINKLER.

2° Pour rechercher la formation éventuelle de l'hydroxyméthylfurfural dans le raisin lui-même, on a opéré sur les huit cépages : *Aramon*, *Carignan*, *Morastel-Bouschet*, *Alicante-Bouschet*, *Terret Noir*, *Terret Blanc*, *Muscat de Hambourg*, *Servent*. Tous les deux jours d'abord, tous les jours ensuite, on a prélevé d'une part des raisins à maturité, d'autre part des raisins surmûris. De plus les grains étaient triés à la main, en séparant dans les mêmes grappes les grains mûrs ou surmûris, de façon à avoir finalement deux lots de même origine, l'un mûr, l'autre surmûri, et rigoureusement comparables. Chaque cépage a été ainsi suivi jusqu'à passerillage sur souche.

Chaque prélèvement était de deux kilogrammes pour chaque série d'essai.

Le jus de raisin était extrait au pressoir à main dans les quelques heures qui suivaient sa vendange.

En outre un passerillage artificiel sur paille au soleil a été réalisé sur les raisins de deux cépages : *Carignan* et *Terret Blanc*. Le jus correspondant a été également extrait au pressoir à main.

Dans tous les cas, l'hydroxyméthylfurfural a été recherché par la méthode colorimétrique de WINKLER.

RÉSULTATS

— Le tableau ci-dessous indique les teneurs en hydroxyméthylfurfural, en mg /litre trouvées en fonction de la température et de la durée du chauffage.

Hydroxyméthylfurfural en mg /litre.

Température	Durée du chauffage en minutes					
	5	10	15	20	25	30
70°C	0	0	0	0	0	0
75°C	0	0	0	0	0	0
80°C	0	0	1	2	2	3
85°C	1	1	2	3	5	7
90°C	3	5	9	15	21	26
95°C	4	8	13	17	24	33

— En ce qui concerne les huit cépages étudiés on n'a trouvé d'hydroxyméthylfurfural ni après surmaturation ni après passerillage sur paille ou sur souche.

DISCUSSION ET CONCLUSION

a) *Température et durée de chauffage des jus*

— Pour des températures de chauffage inférieures à 80°C, il ne se forme pas d'hydroxyméthylfurfural, même au bout de trente minutes.

— On note l'apparition de l'hydroxyméthylfurfural après 15 minutes de chauffage à 80°C et après 5 minutes de chauffage à 85°C.

— A 80° et 85°C, les quantités maximales d'hydroxyméthylfurfural décelé sont respectivement de 3 et 7 mg /litre après 30 minutes de chauffage.

— A 90 et 95°C, les quantités d'hydroxyméthylfurfural dosées sont nettement plus importantes. A 90°C, on trouve déjà 15 mg /litre au bout de 20 minutes

26 mg/litre au bout de 30 minutes. A 95°C, on décèle 13 mg /litre au bout de 15 minutes et 33 mg /litre au bout de 30 minutes.

b) *Hydroxyméthylfurfural dans le raisin*

Les phénomènes biochimiques liés à la surmaturation et au passerillage n'ont provoqué en aucun cas, au cours de ces essais, la formation d'hydroxyméthylfurfural.

Or les raisins destinés à la préparation de jus devraient être vendangés un peu avant maturité habituelle de façon à conserver au produit préparé un rapport acidité /sucre satisfaisant. Cette précocité dans la cueillette se généralise. Par conséquent cette cause hypothétique de formation de HMF au cours de la surmaturation ne doit pas être mise en avant.

Les conclusions sont donc les suivantes :

1° La formation d'hydroxyméthylfurfural au cours du chauffage prolongé d'un jus de raisin n'est mesurable qu'aux températures relativement élevées (85°C dans les essais mentionnés) et pendant un temps prolongé de 5 minutes au moins.

2° L'existence d'hydroxyméthylfurfural dans le raisin lui-même au cours de la surmaturation ou du passerillage n'a pas été constatée sur les huit cépages étudiés.

3° La température et la durée du chauffage paraissant être des causes déterminantes de formation d'hydroxyméthylfurfural dans les jus, la codification des techniques de préparation des jus de raisin par chauffage, pasteurisation ou désulfitation est nécessaire.

4° Dès à présent il est recommandé de chauffer pendant les temps les plus courts compatibles avec des températures aussi basses que possible.

Reçu pour publication en avril 1962

SUMMARY

THE REASONS FOR THE PRESENCE OF HYDROXYMETHYLFURFURAL IN GRAPE JUICE

It is certain that a sizeable amount of hydroxymethylfurfural can be found in some grape juices. The reasons for the presence of hydroxymethylfurfural were studied, both in the grapes and during the manufacture of the juice. The influence of temperature and the lenght of heating were studied.

A temperature of 80°C is a threshold below which no traces of hydroxymethylfurfural were evidenced after heating 30 minutes. Hydroxymethylfurfural can be found only by heating above 80°C. After heating 25 minutes at 85°C, 5 mg per liter were found. Practically, the maximum allowable temperature is 85°C, provided heating does not last over 5 minutes.

The grapes from the eight stocks studied, *Aramon*, *Carignan*, *Morastel-Bouschet*, *Alicante-Bouschet*, *Terret Noir*, *Terret Blanc*, *Muscat de Hambourg*, and *Servent*, do not contain any hydroxymethylfurfural, even if the grapes were overripe or shrivelled. This was found for both stocks placed on trial for this, *Carignan* and *Terret Blanc*.

The lenght of heating and the temperature play a major part in the elaboration of hydroxymethylfurfural in grape juice.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Collon Y., 1962. L'hydroxyméthylfurfural dans les jus de raisin. Formation et méthodes de dosage. *Ann. Technol. agric.* **11**, 167-174.

Winkler O., 1955. Beitrag zum Nachweiss und zur Bestimmung von Oxymethylfurfurol in Honig und Kunsthonig. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **103**, n° 3, 161.

Ann. Technol. agric., 1962, **11** (4), 275-371

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES RÉACTIONS ENZYMATIQUES DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES PEU HYDRATÉS : LA DÉGRADATION DE L'AMIDON PAR LES AMYLASES EN FONCTION DE L'ACTIVITÉ DE L'EAU ET DE LA TEMPÉRATURE (1)

DEUXIÈME PARTIE

R. DRAPRON et A. GUILBOT
Avec la collaboration technique de Françoise BARBE

Laboratoire de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales, C. E. R. D. I. A., Le Noyer Lambert, Massy (Seine-et-Oise)

II. — RÉSULTATS OBTENUS ET DISCUSSION

A. — Affinité pour l'eau des milieux enzyme-substrat et de leurs constituants

Sur les figures 5, 12, 13 et 14, nous avons tracé, à partir des points expérimentaux, les isothermes de sorption de milieux enzyme-substrat et de leurs constituants en portant en abcisse l'activité de l'eau a (2) et en ordonnée la quantité d'eau fixée par gramme de substance sèche H. Dans les tableaux 5, 6, 7, 9 et 11, pour des activités de l'eau croissantes par fractions de 0,05 ou de 0,1 nous avons indiqué, pour 100 g de substance sèche, les hydratations H interpolées à partir des courbes ainsi que les quantités h « d'eau non solvante », calculées jusqu'à l'activité 1, d'après

(1) Travail ayant fait l'objet d'une thèse soutenue par R. DRAPRON pour obtenir le titre d'Ingénieur C. N. A. M.

La première partie est parue dans les Annales de Technologie agricole, 1962, n °3.

(2) Dans la suite de l'exposé, pour plus de commodité, nous utiliserons indistinctement pour exprimer l'activité de l'eau *a*, le terme humidité relative (H. R.) ou tension relative de la vapeur d'eau.

l'équation de la partie linéaire des isothermes. Il est ainsi possible de fixer l'activité de l'eau à partir de laquelle apparaît « l'eau solvante », de déterminer la valeur de celle-ci aux diverses humidités relatives, $S = H - h$, et de suivre son évolution.

Cette distinction entre « eau solvante » et « eau non solvante » vis-à-vis des molécules d'eau elles-mêmes est basée sur l'hypothèse que les résultats obtenus par GUILBOT et LINDENBERG (1960) sont extrapolables à d'autres milieux complexes. Il est en effet particulièrement intéressant de déterminer dans quelle mesure une corrélation peut être établie, d'une part, entre le point d'apparition de « l'eau solvante » et le démarrage des réactions enzymatiques ; d'autre part, entre la quantité « d'eau solvante » et l'intensité de l'action enzymatique.

1° *Isothermes de sorption de l'amidon soluble cryodéshydraté, à 21 et 31°C.*

Le tableau 5 représente les résultats correspondants aux isothermes de sorption de l'amidon soluble, à 21 et 31 ± 0,5°C. L'écart observé entre les deux isothermes varie régulièrement de 0,6 à 0,8 p. 100 d'eau dans la zone d'activité située entre 0,05 et 0,7 ; il reste constant ensuite.

Les parties linéaires des courbes se situent respectivement entre 0,06 et 0,67 à 21°C et entre 0,06 et 0,72 à 31°C, elles ont pour équations :

$$\underline{h}\,(21°C) = 20{,}4\,a + 3{,}6\,;$$
$$\underline{h}\,(31°C) = 20{,}2\,a + 3{,}0.$$

L'examen des spectres de diffraction des rayons X de l'amidon soluble montre que l'on a un produit amorphe à l'état sec et que l'organisation des régions cristallines apparaît pour une teneur en eau voisine de 10 p. 100, ce qui est en accord avec les résultats déjà obtenus avec l'amidon natif (GUILBOT, CHARBONNIÈRE et DRAPRON, 1961).

TABLEAU 5

Hydratation de l'amidon soluble en fonction de l'activité de l'eau, à 21 et à 31°C.

Activité de l'eau (a)	$h = 20{,}4\ a + 3{,}6$ T = 21°C			$h = 20{,}2\ a + 3$ T = 31°C		
	H_2O p. 100 de substance sèche (H)	h	« Eau solvante » (S)	H_2O p. 100 de substance sèche (H)	h	Eau « solvante » (S)
0,05	4,4	4,4		3,8	3,8	
0,10	5,6	5,6		5,0	5,0	
0,20	7,6	7,6		7,0	7,0	
0,30	9,7	9,7		9,0	9,0	
0,40	11,7	11,7		11,0	11,0	
0,50	13,75	13,75		13,0	13,0	
0,60	15,8	15,8		15,0	15,0	
0,65	16,9	16,9		16,1	16,1	
0,70	18,0	17,9	0,1	17,1	17,1	0
0,75	19,4	18,9	0,5	18,4	18,1	0,3
0,80	20,9	20,0	0,9	19,8	19,1	0,7
0,85	22,8	21,0	1,8	21,7	20,1	1,6
0,90	25,6	22,0	3,6	24,4	21,1	3,3
1,00		24,0			23,2	

Pour une activité de 0,9 environ, on observe une rétraction importante de l'amidon qui se transforme en une masse compacte et rigide.

2° *Isothermes de sorption des amylases alpha et bêta à 21 et 31°C.*

a) *Préparations initiales cryodéshydratées.*

Dans la figure 12 et le tableau 6 sont représentés les résultats correspondant aux isothermes de sorption des préparations commerciales d'alpha et de bêta amylases aux températures de 21 et 31°C. Ces courbes sont assez caractéristiques de la pré-

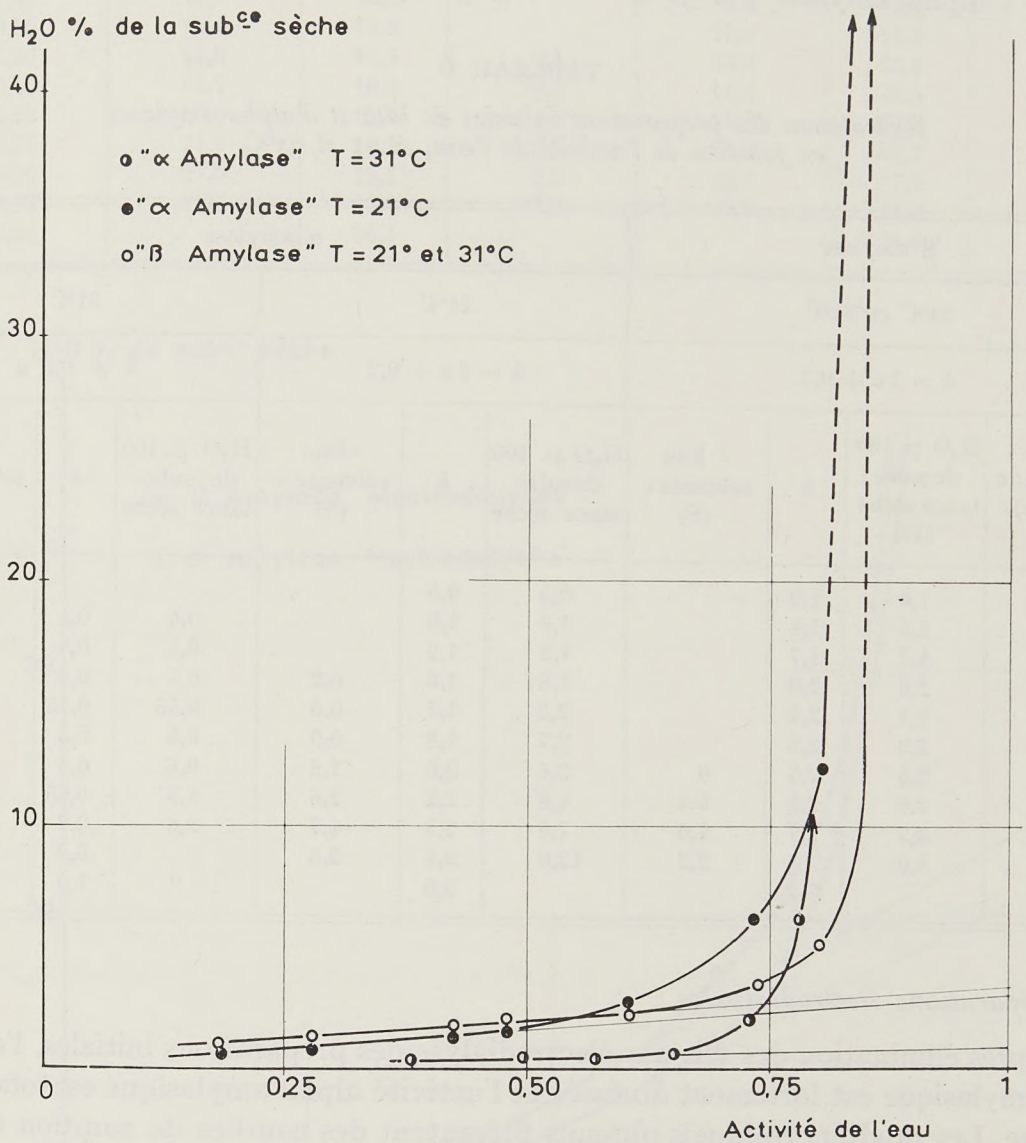


FIG. 12. — *Isothermes de sorption des préparations commerciales d'alpha et de bêta amylases, à 21 et 31°C*

sence, en quantité prépondérante, d'un mélange de sels, dont au moins un des constituants forme une solution saturée entre 77 et 82 p. 100 d'humidité relative, ainsi qu'il a été possible de l'observer.

La courbe de sorption de la préparation de bêta amylase ne présente pratiquement pas de différence entre 21 et 31°C ; par contre, les deux isothermes sont sensiblement différents pour celle d'alpha amylase. Ce comportement différent peut pro-

venir, soit des protéines enzymatiques elles-mêmes, soit du fait que le mélange de sels n'est peut-être pas le même dans les deux cas.

Les courbes présentent une partie linéaire :

— pour la « bêta amylase » à 21 et 31°C, jusqu'à une activité de l'eau de 0,65 ;

— pour « l'alpha amylase », jusqu'à une activité de l'eau de 0,50 à 21°C et de 0,57 à 31°C.

Les droites ont pour équations :

— « bêta amylase » à 21 et 31°C : $\underline{h} = 3a + 0{,}3$

— « alpha amylase » à 21°C : $\underline{h} = 3a + 0{,}2$

— « alpha amylase » à 31°C : $\underline{h} \neq 0{,}05a$

TABLEAU 6

Hydratation des préparations initiales de bêta et d'alpha amylases en fonction de l'activité de l'eau, à 21 et 31°C.

β amylase				α amylase					
21°C et 31°C				21°C			31°C		
$h = 3a + 0{,}3$				$h = 3a + 0{,}2$			$h \neq 0{,}5\ a$		
Activité de l'eau (a)	H_2O p. 100 de substance sèche (H)	h	« Eau solvante » (S)	H_2O p. 100 de substance sèche	h	« Eau solvante » (S)	H_2O p. 100 de substance sèche	h	« Eau solvante » (S)
0,20	1,0	1,0		0,5	0,5				
0,30	1,4	1,4		1,0	1,0		0,4	0,4	
0,40	1,7	1,7		1,2	1,2		0,4	0,4	
0,50	2,0	2,0		1,8	1,6	0,2	0,4	0,4	
0,55	2,2	2,2		2,2	1,7	0,5	0,45	0,45	
0,60	2,3	2,3		2,7	1,8	0,9	0,5	0,5	
0,65	2,5	2,5	0	3,6	2,0	1,6	0,6	0,6	
0,70	3,0	2,6	0,4	4,8	2,2	2,6	1,3	0,65	0,65
0,75	3,7	2,7	1,0	7,0	2,3	4,7	2,5	0,7	1,8
0,80	5,0	2,8	2,2	12,0	2,4	9,6		0,8	
1,00		3,4			3,0			1,0	

b) *Préparations électrodialysées.*

Après élimination des sels par électrodialyse des préparations initiales, l'activité bêta amylasique est fortement abaissée et l'activité alpha amylasique est totalement détruite. Les produits résiduels obtenus présentent des courbes de sorption d'allure sensiblement identique à 31°C (Figure 13 et Tableau 7).

Le point d'apparition de l'eau solvante est situé entre 58 et 62 p. 100 d'H. R. et les équations des parties linéaires sont :

— pour la préparation d'alpha amylase : $h = 23{,}2a + 0{,}9$,

— pour la préparation de bête amylase : $h = 19{,}4a + 1{,}6$.

Il est vraisemblable, comme nous allons le voir pour d'autres mélanges, que la courbe de sorption des préparations amylasiques sur support salin représente, en

TABLEAU 7

Hydratation de la bêta et de l'alpha amylases électrodialysées en fonction de l'activité de l'eau, à 31°C.

Alpha amylase ; activité alpha amylasique nulle $h = 23{,}2\,a + 0{,}9$				Bêta amylase ; activité bêta amylasique : 80 $h = 19{,}4\,a + 1{,}6$		
Activité de l'eau (a)	H_2O p. 100 de substance sèche (H)	h	« Eau solvante » (S)	H_2O p. 100 de substance sèche (a)	h	« Eau solvante » (S)
0,05	2,0	2,1		2,4	2,6	
0,10	3,0	3,2		3,5	3,6	
0,20	5,6	5,6		5,6	5,6	
0,30	7,9	7,9		7,5	7,5	
0,40	10,2	10,2		9,4	9,4	
0,50	12,6	12,6		11,3	11,3	
0,60	15,0	14,9	0,1	13,3	13,3	
0,65	16,7	16,0	0,7	14,5	14,3	0,2
0,70	19,0	17,2	1,8	16,3	15,3	1,0
0,75	21,9	18,3	3,6	19,2	16,2	3,0
0,80	27,0	19,5	7,5	24,6	17,2	7,4
0,85	38,5	20,6	17,9	35,0	18,2	16,8
1,00		24,1			21,0	

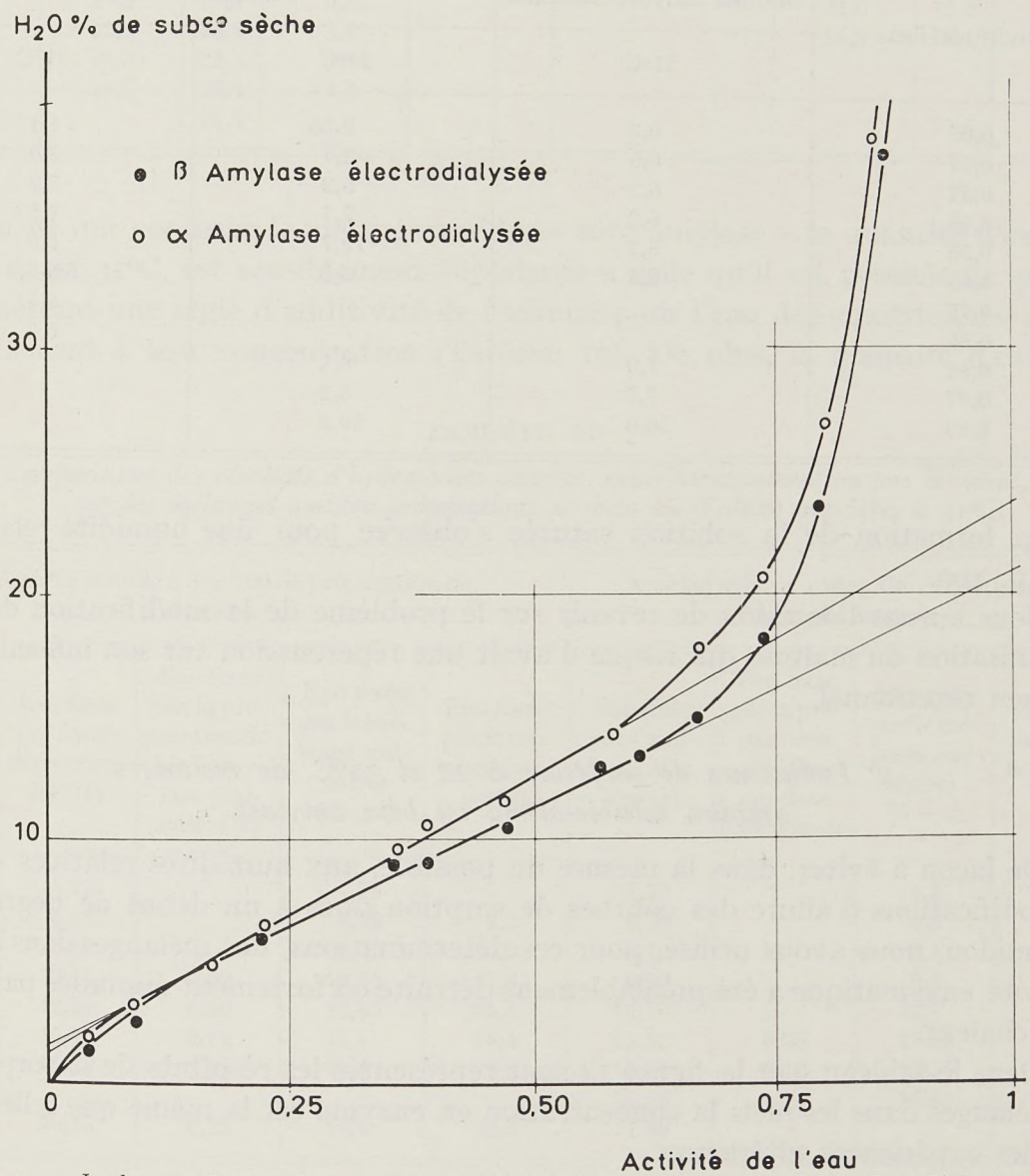


FIG. 13. — *Isothermes de sorption des préparations de bêta et d'alpha amylases électrodialysées, à 31°C*

première approximation, une résultante des courbes de sorption des différents constituants par loi d'additivité.

3° *Isothermes de sorption du maltose.*

Le comportement, en sorption à 21°C, du maltose cristallisé anhydre et du maltose amorphe a été précédemment indiqué (figure 5).

Le maltose amorphe, après avoir fixé une quantité d'eau supérieure à celle de l'hydrate, passe à l'état plus stable de maltose monohydraté ; les résultats indiqués dans le tableau 8 montrent qu'il en est de même à 31°C, la cristallisation se produisant au-dessus de 43 p. 100 d'H. R.

TABLEAU 8

Hydratation du maltose cristallisé et amorphe en fonction de l'activité de l'eau, à 21 et 31°C (cf. figure 5)

(Teneur en eau théorique de l'hydrate à une molécule d'eau 5,26 p. 100 ; trouvé initialement : 6,35 p. 100).

Activité de l'eau	Maltose anhydre cristallisé	Maltose amorphe	
	21°C	21°C	31°C
0,07	0,3	0,95	1,1
0,17	0,5	2,7	3,0
0,32	6,2	5,2	5,7
0,43	6,2	7,7	7,5
0,55	6,2	10,7	6,0
0,65	6,3	6,2	6,5-6,0
0,75			6,4
0,80			6,4
0,82	7,0	6,4	
0,87	7,7	6,2	
0,93	50,0	50,0	

La formation de la solution saturée s'observe pour une humidité relative de 90-95 p. 100.

Nous aurons l'occasion de revenir sur le problème de la modification de l'état d'organisation du maltose qui risque d'avoir une répercussion sur son influence dans le milieu réactionnel.

4° *Isothermes de sorption, à 21 et 31°C, de mélanges amidon soluble-alpha ou bêta amylase.*

De façon à éviter, dans la mesure du possible, aux humidités relatives élevées, les modifications d'allure des courbes de sorption dues à un début de dégradation de l'amidon, nous avons utilisé, pour ces déterminations, des mélanges dans lesquels l'activité enzymatique a été préalablement détruite ou fortement diminuée par action de la chaleur.

Dans le tableau 9 et la figure 14 sont représentés les résultats de la sorption de ces mélanges dans lesquels la concentration en enzyme est la même que celle utilisée dans les expériences ultérieures.

TABLEAU 9

Hydratation de mélanges amidon-« bêta amylase » inactivée et amidon-« alpha amylase » inactivée.

Amidon — « bêta amylase » T = 31°C $h = 20{,}3\ a + 4{,}2$				Amidon — « bêta amylase » T = 21°C $h = 20{,}7\ a + 3{,}7$			Amidon — « alpha amylase » T = 31°C $h = 18{,}2\ a + 3{,}6$		
Activité de l'eau (a)	H_2O p. 100 de la substance sèche (H)	h	« Eau solvante » (S)	H_2O p. 100 de la substance sèche (H)	h	« Eau solvante » (S)	H_2O p. 100 de la substance sèche (H)	h	« Eau solvante » (S)
0,05		5,2							
0,10		6,2		5,7	5,7				
0,20	8,2	8,2		7,8	7,8				
0,30	10,3	10,3		9,9	9,9		9,0	9,0	
0,40	12,3	12,3		12,0	12,0		10,8	10,8	
0,50	14,4	14,4		14,0	14,0		12,7	12,7	
0,60	16,4	16,4		16,1	16,1		14,7	14,5	0,2
0,65	17,4	17,4		17,2	17,2		16,4	15,4	1,0
0,70	18,6	18,4	0,2	18,8	18,2	0,6	18,5	16,3	2,2
0,75	20,3	19,4	0,9				21,0	17,2	3,8
0,80	22,8	20,4	2,4				25,0	18,1	6,9
0,85	26,5	21,4	5,1						
0,90	33,5	22,4	11,1						
1,00		24,4						21,8	

En ce qui concerne le mélange amidon-« bêta amylase », la quantité d'eau qu'il fixe, à 21 et 31°C, est sensiblement supérieure à celle qu'il est possible de prévoir, en admettant une règle d'additivité de l'affinité pour l'eau des constituants proportionnellement à leur concentration (Tableau 10). De plus, la quantité d'eau fixée

TABLEAU 10

Comparaison des résultats d'hydratation obtenus, expérimentalement ou par le calcul, sur des mélanges amidon-préparations de bêta ou d'alpha amylase, à 31°C.

	Amidon soluble à 5 p. 100 de préparation de bêta amylase				Amidon soluble à 10 p. 100 de préparation d'alpha amylase			
H. R. p. 100	Eau fixée par l'amidon (calculée) (b)	Eau fixée par la préparation de bêta amylase (calculée) (c)	Eau fixée par le mélange (calculée) ($b + c$)	Eau fixée par le mélange (mesurée)	Eau fixée par l'amidon (calculée) (b)	Eau fixée par la préparation d'alpha amylase (calculée) (c)	Eau fixée par le mélange (calculée) ($b + c$)	Eau fixée par le mélange (mesurée)
10	4,75		4,75		4,50		4,5	
20	6,65		6,65	8,2	6,30		6,3	
30	8,55		8,55	10,3	8,10		8,1	9,0
40	10,45	0,09	10,55	12,3	9,90		9,9	10,8
50	12,35	0,10	12,45	14,4	11,70		11,7	12,6
60	14,25	0,12	14,4	16,4	13,50	0,06	13,55	14,8
70	16,25	0,15	16,4	18,6	15,40	0,13	15,55	18,5
75					16,56	0,28	16,85	21,1
80	18,15	0,25	18,4	22,8	17,80			

à 31°C est légèrement plus grande qu'à 21°C, ce qui va à l'inverse de l'évolution normale des isothermes avec la température et laisse également supposer une interaction entre les constituants.

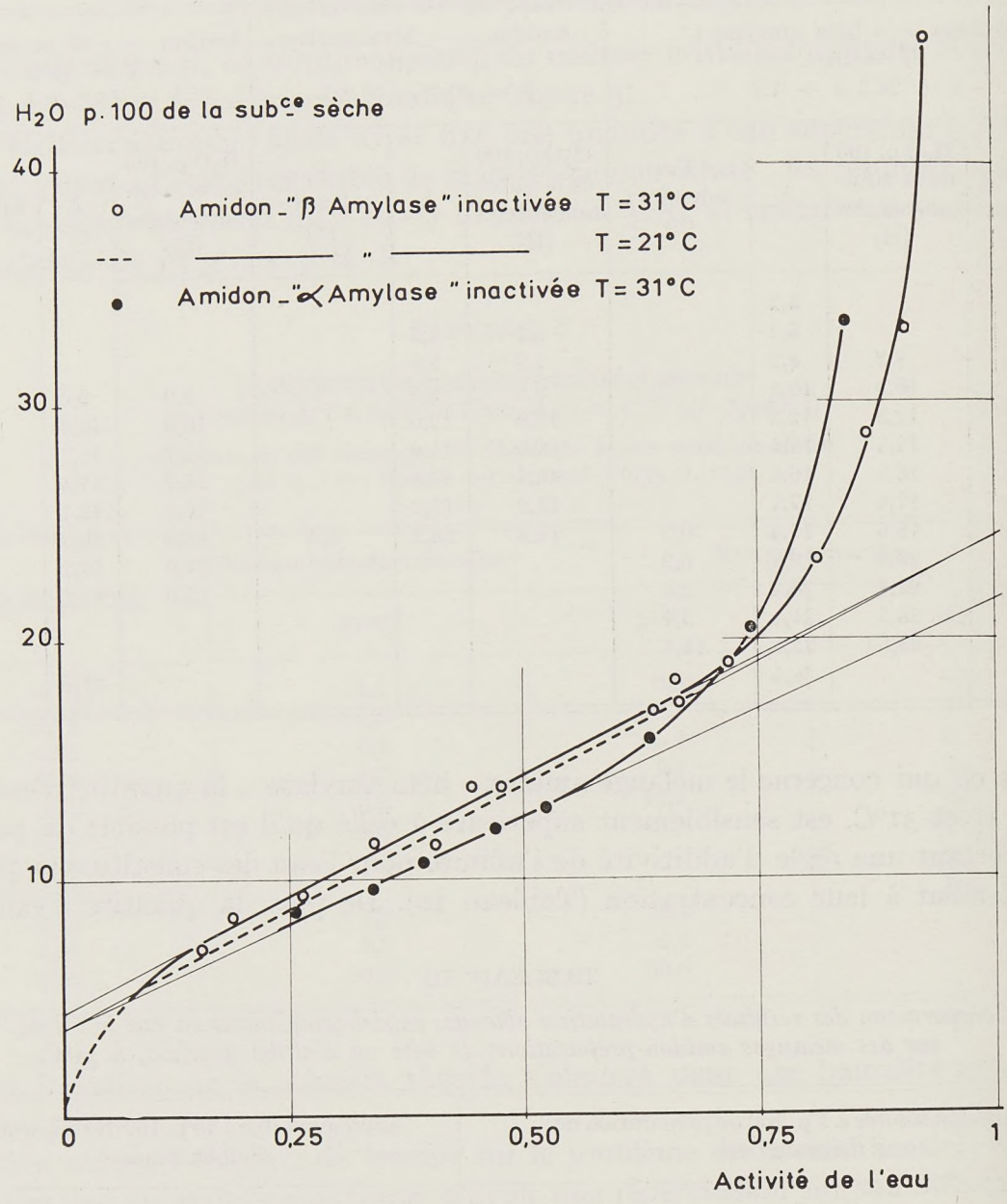


Fig. 14. — *Isothermes de sorption à 21 et 31° C de mélanges inactifs amidon soluble- « bêta amylase », amidon soluble- « alpha amylase ».*

Les courbes se séparent des parties linéaires, à une humidité relative de 66-68 p. 100 dans le cas des mélanges contenant la « bêta amylase » à 21 et 31°C et à une humidité relative d'environ 60 p. 100 pour le mélange contenant « l'alpha amylase ».

Les droites ont respectivement pour équations :

— mélange amidon-« bêta amylase » { à 21°C : $h = 20{,}7a + 3{,}7$; à 31°C : $h = 20{,}3a + 4{,}2$

— mélange amidon-« alpha amylase » à 31°C : $h = 18{,}2a + 3{,}6$

5° *Isothermes de sorption à 31°C de mélanges cryodéshydratés amidon soluble-maltose.*

Dans le tableau 11, nous avons rapporté les résultats de la sorption de mélanges amidon-maltose pour des concentrations en maltose de 2 et 10 p. 100. Les courbes obtenues sont très proches de celles qu'il est possible de calculer à partir des courbes d'affinité pour l'eau des constituants du mélange (tableau 12).

TABLEAU 11

Hydratation de mélanges amidon-maltose, en fonction de l'activité de l'eau, à 31°C.

Activité de l'eau (a)	Mélange à 2 p. 100 de maltose $h = 18{,}8\,a + 3{,}2$			Mélange à 10 p. 100 de maltose $h = 17{,}3\,a + 3{,}2$		
	H_2O p. 100 de substance sèche (H)	h	« Eau solvante » (S)	H_2O p. 100 de substance sèche (H)	h	« Eau solvante » (S)
0,05	3,5	4,1		3,5	4,1	
0,10	5,0	5,1		4,7	4,9	
0,20	6,9	6,9		6,6	6,6	
0,30	8,8	8,8		8,4	8,4	
0,40	10,7	10,7		10,1	10,1	
0,50	12,6	12,6		11,8	11,8	
0,60	14,4	14,4		13,6	13,6	
0,65	15,5	15,4	0,1	14,4	14,4	0
0,70	16,6	16,2	0,4	15,4	15,3	0,1
0,75	17,9	17,2	0,7	16,7	16,1	0,6
0,80	19,4	18,1	1,3	18,6	17,0	1,6
0,85	21,5	19,1	2,4	21,5	18,0	3,5
0,90	25,5	20,1	5,5	26,5	18,8	7,7
1,00		22,0			20,5	

TABLEAU 12

Comparaison des résultats d'hydratation obtenus, expérimentalement ou par le calcul, sur des mélanges amidon-maltose, à la température de 31°C.

	Amidon soluble + 10 p. 100 de maltose				Amidon soluble + 2 p. 100 de maltose			
H. R. p. 100	Eau fixée par l'amidon (calculée) (b)	Eau fixée par le maltose (calculée) (c)	Eau fixée par le mélange (calculée) ($b + c$)	Eau fixée par le mélange (mesurée)	Eau fixée par l'amidon (calculée) (b)	Eau fixée par le maltose (calculée) (c)	Eau fixée par le mélange (calculée) ($b + c$)	Eau fixée par le mélange (mesurée)
10	4,50	0,20	4,7	4,7	4,90	0,04	4,95	5
20	6,30	0,40	6,7	6,6	6,86	0,08	6,95	6,9
30	8,10	0,55	8,6	8,4	8,80	0,10	8,9	8,8
40	9,90	0,75	10,65	10,1	10,80	0,15	10,95	10,7
50	11,70	0,60	12,3	11,8	12,75	0,12	12,9	12,6
60	13,50	0,60	14,1	13,6	14,70	0,10	14,8	14,4
70	15,40	0,60	16,0	15,4	16,75	0,12	16,9	16,6
80	17,80	0,60	18,4	18,6	19,40	0,10	19,6	19,4
90	21,90	solution saturée		26,5	23,90	solution saturée		

Les parties linéaires des deux courbes ont respectivement pour équation :

— mélange à 2 p. 100 de maltose : $h = 18{,}8a + 3{,}2$
— mélange à 10 p. 100 de maltose : $h = 17{,}3a + 3{,}2$

6° *Affinité pour l'eau des mélanges amidon soluble-préparation de bêta amylase active.*

Les courbes de sorption, à 31°C, des mélanges amidon-maltose nous laissent prévoir que l'affinité pour l'eau des mélanges amidon-amylase active évoluera, pour une même humidité relative, au cours de la dégradation.

Nous avons rassemblé, dans le tableau 13, les différents résultats obtenus sur ces produits. Pour les H. R. inférieures au point d'apparition de « l'eau solvante » l'isotherme de sorption du mélange substrat-enzyme actif est assez comparable à celui obtenu pour les mélanges contenant les enzymes inactivés ; par contre, la teneur en eau des milieux maintenus à des humidités relatives pour lesquels l'amylolyse se manifeste, passe dans certains cas par un maximum. En fait, les modifications de structure chimique provoquées par l'hydrolyse se répercutent sur l'affinité du milieu pour l'eau : la quantité d'eau sorbée, augmentant d'une part dans les hautes humidités relatives, au fur et à mesure que la dégradation se poursuit et étant susceptible de diminuer d'autre part, en raison de la cristallisation possible du maltose.

TABLEAU 13

Évolution de la teneur en eau de mélanges amidon soluble-« bêta amylase » active, à 31°C.

H. R. p. 100	Temps en heures	H_2O p. 100 de la substance sèche	H. R. p. 100	Temps en heures	H_2O p. 100 substance sèche
24	120	8,50	85	2	32,40
29	à	9,20	85	7,35	52,10
39	2 208	11,60	85	15,10	*53,10*
52		14,10	85	20,45	44,50
66		14,70	85	190	43,60
73	24	19,20	92	3	57,50
73	96	*21,40*	92	6	*78,50*
73	336	18,70	92	9	71,60
			92	25,20	101,70
84	2	24,80			
84	12	27,40			
84	26	*30,00*			
84	120	26,10			

On conçoit ainsi la complexité des phénomènes puisque, finalement, cette évolution d'hydratation du milieu influe à son tour sur le comportement ultérieur de l'action amylolytique.

B. — Comportement de la bêta amylase en fonction de l'activité de l'eau

Les expériences ont été effectuées sur les mélanges cryodéshydratés contenant 5 parties de préparation de bêta amylase pour 100 d'amidon soluble. On a, d'une part, mesuré l'activité « intrinsèque » de l'enzyme à la suite de différents traitements

subis par le mélange, d'autre part, suivi l'évolution de l'action enzymatique éventuelle, à 21 et 31°C, en fonction de l'humidité relative, en opérant sous vide partiel dans l'appareillage précédemment décrit.

Bien que, dans certains cas, les expériences aient porté sur des temps très longs, aucune altération par les microorganismes n'était à craindre dans le domaine des faibles humidités relatives examinées. Pour les valeurs d'activité de l'eau supérieure à 0,75, la durée des expériences est notablement plus courte. Nous avons d'ailleurs vérifié qu'il ne se produisait aucun développement des microorganismes pendant la durée des différents essais.

Activité bêta amylasique « intrinsèque » de divers mélanges en fonction de leurs conditions de préparation et de stockage.

Dans le tableau 14 sont rassemblées les activités obtenues avec :

— la préparation amylasique initiale, cryodéshydratée telle quelle ou en présence de maltose ou d'amidon.

— la préparation amylasique cryodéshydratée telle quelle ou en présence de maltose et conservée à des humidités relatives de 73 et 80 p. 100.

On observe, après cryodéshydration, une diminution de 15 p. 100 de l'activité initiale pour la préparation amylasique telle quelle et de 30 p. 100 en présence de son substrat. Par contre, le maltose exerce une action protectrice au cours de la déshydration et également au cours d'un stockage de 30 jours à 31°C et 73-80 p. 100 d'humidité relative.

TABLEAU 14

Activité β amylasique de diverses préparations.

	mg de maltose formé par mn et par mg d'azote	p. 100 d'activité conservée
β amylase initiale	143	
β amylase cryodéshydratée	123-120	85
Mélange cryodéshydraté, β amylase-amidon	100	70
β amylase + maltose, (mélange cryodéshydraté)	143-145	100
β amylase cryodéshydratée, passée en sorption à 31°C et 80 p. 100 H. R. pendant 30 jours	94	66
β amylase + maltose, (mélange cryodéshydraté, passé en sorption à 31°C et 73 p. 100 H. R. pendant 30 jours).....	143	100

Dans le tableau 15 sont indiquées les activités bêta amylasiques résiduelles du mélange cryodéshydraté enzyme-substrat, après stockage à différentes humidités relatives à 21 et 31°C.

TABLEAU 15

Activité β amylasique de mélanges enzyme-substrat, après sorption à 21 et 31°C.

Sorptions à 21°C			Sorptions à 31°C		
Activité de l'eau	Durée de l'expérience, en jours	mg de maltose formé par mn et par mg. d'azote	Activité de l'eau	Durée de l'expérience en jours	mg de maltose formé par mn et par mg d'azote
			0,95	2	93
			0,80	6	57
0,73	250	81	0,73	12	52
0,65	210	53	0,66	76	76
0,51	200	84			
0,38	210	64	0,39	76	87
0,28	250	77	0,29	76	86
0,22	200	64	0,24	94	63
0,17	250	85	0,18	94	82
0,08	200	54	0 (P_2O_5)	100	60
0,04	200	67			
mélange initial		100	$\neq$ 1,00	2	100

On note des diminutions de 15 à près de 50 p. 100, sans que l'on puisse déduire une relation nette entre l'humidité relative et cette perte d'activité ; il est possible que plusieurs facteurs entrent en jeu. En raison de cette destruction partielle de l'activité amylasique au cours du stockage des milieux en fonction de l'humidité relative, les résultats que nous allons exposer, concernant l'étude de la vitesse de la réaction enzymatique dans ces conditions, ne devront être considérés que comme semi-quantitatifs.

Comportement du mélange bêta amylase-substrat dans la zone des faibles activités de l'eau.

1° *A la température de* 21°C (*tableau* 16).

Pour des activités de l'eau situées entre 0 et 0,73, même après 250 jours, on n'observe que des variations minimes de la teneur en produits extractibles par l'alcool à 80 p. 100 (teneur exprimée en maltose pour 100 grammes de mélange). Bien que le nombre des points expérimentaux soit assez restreint, il semble que la quantité de produits extractibles passe par un léger maximum au bout de 40 à 100 jours. Pour une activité de 0,80 et pour une durée inférieure à 30 jours, on note le même genre de phénomène.

2° *A la température de* 31°C (*figure* 15).

A cette température, pour des activités allant jusqu'à 0,66, on observe la même allure d'évolution qu'à 21°C, mais avec une amplitude plus importante et pour des durées plus courtes. La teneur en glucides extractibles à l'alcool augmente d'abord, puis diminue en fonction du temps pour se stabiliser ensuite à des valeurs parfois inférieures à la teneur initiale ; un phénomène comparable a déjà été entrevu par Kiermeier et Coduro (1954 *a*) au cours de leurs travaux. Nous avons également

TABLEAU 16

Évolution de la teneur en glucides extractibles par l'alcool à 80 p. 100 (a) (exprimée en g de produit sec), en fonction du temps et pour différentes activités de l'eau à 21°C. Les teneurs en eau correspondant à chaque prélèvement sont indiquées en (b).

Activités de l'eau →	0,17		0,22		0,28		0,38		0,51		0,65		0,74		0,80	
Temps en jours ↓	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
1	0,30	9,10			0,52	9,70			0	13,00			— 0,20	16,60	0,16	24,00
4															0,24	24,40
5															0,02	24,30
8															0,46	23,10
11															0,27	23,50
15															— 0,30	23,75
29															— 0,30	24,50
43	0,60	9,10			0,43	9,60			0,97	13,00			0,82	16,60		
66			0,37	9,50			0,66	11,70			0,76	15,50				
103	0,08	9,20			0,56	9,60										
114									0,40	12,90			1,16	16,50		
200			0,18	9,50							0,23	15,50				
250	0,36	9,10			0,17	9,40	0	11,70	0,06	12,90			0,30	16,60		

fait des observations identiques au début de l'évolution de milieux placés à des humidités relatives suffisamment élevées pour qu'il y ait libération ultérieure de maltose ; nous aurons l'occasion d'examiner ces faits plus en détail au cours de l'action de la bêta amylase à des humidités relatives plus élevées.

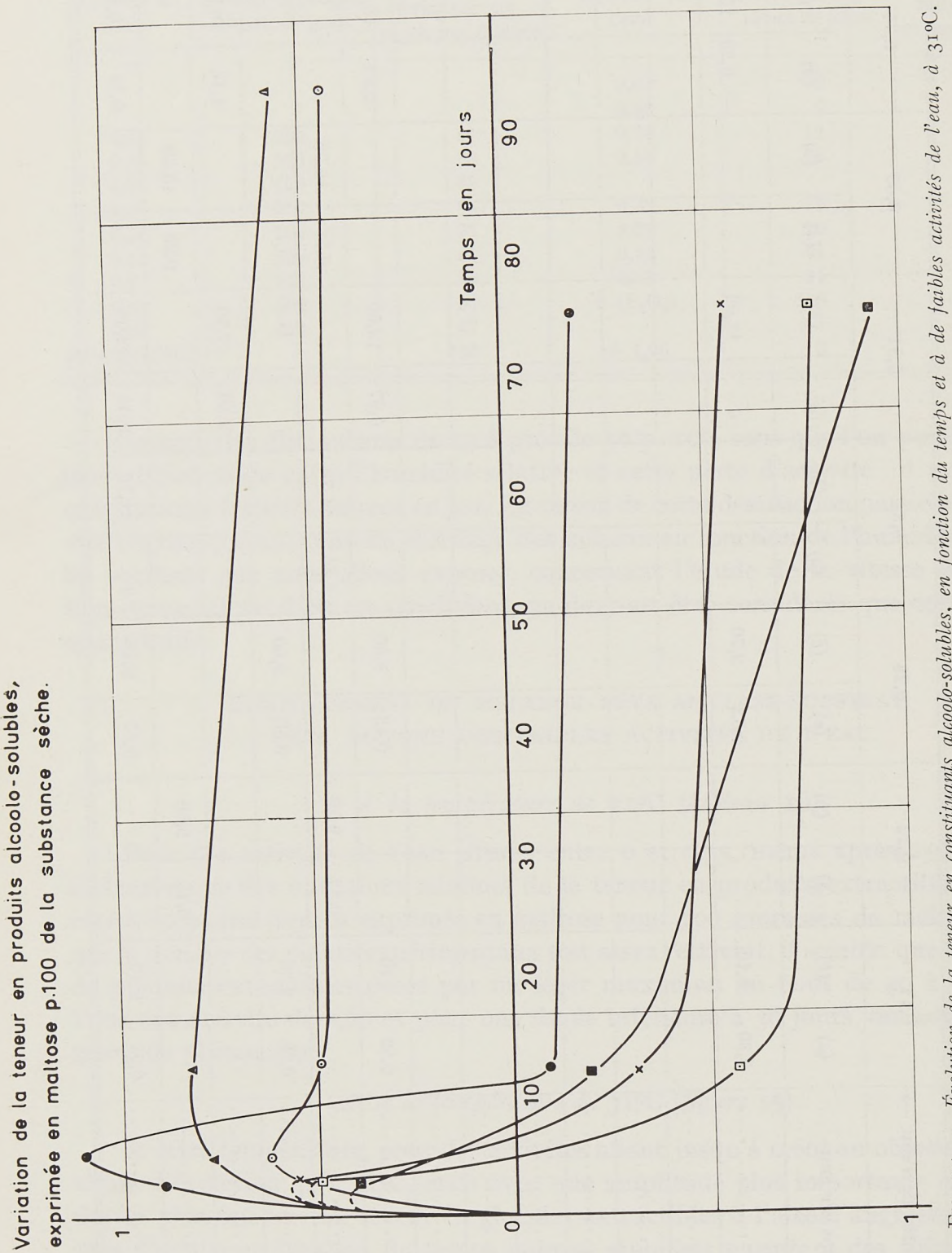


FIG. 15. — *Évolution de la teneur en constituants alcoolo-solubles, en fonction du temps et à de faibles activités de l'eau, à* 31°C.

Comportement du mélange bêta amylase-substrat dans la zone des activités de l'eau plus élevées.

1° *A la température de* 21°C (*tableau* 17 *et figure* 16).

Nous avons vu que l'on n'observe pas d'action hydrolysante appréciable jusqu'à environ 75 p. 100 d'humidité relative au bout de 250 jours et jusqu'à 80 p. 100 après un mois ; la libération de glucides alcoolo-solubles, représentés essentiellement par du maltose, devient notable à partir de 85-87 p. 100 d'humidité relative, au bout de 5 à 10 heures. Après 24 heures, la réaction tend pratiquement vers un palier dont la valeur est d'autant plus importante que l'activité de l'eau est plus élevée : ainsi, la limite atteinte à une activité de l'eau de 0,87 est de 5,5 p. 100 ; à 0,92, de 10 p. 100, et, à l'activité 1, de 24 p. 100.

TABLEAU 17

Accroissement, en fonction du temps, de la teneur en glucides extractibles par l'alcool à 80 *p.* 100 (*exprimée en g de maltose anhydre pour* 100 *g de substance sèche*), *pour des activités de l'eau de* 0,87 ; 0,92 *et* 1 *à* 21°C. (*Teneur initiale :* 4,80 *p.* 100).

Temps en heures	Activités de l'eau					
	0,87		0,92		1,0 #	
	H_2O p. 100 de la substance sèche	« maltose » formé	H_2O p. 100 de la substance sèche	« maltose » formé	H_2O p. 100 de substance la sèche	« maltose » formé
2,10			33,40	0,60*		
2,15 ..					50,20	6,13
3,00 ..					63,00	8,34
3,10 ..			36,80	4,60		
3,45 ..	30,90	0,85*				
4,15 ..	27,20	0,40				
5,05 ..			38,30-38,30	5,70-5,70*		
5,30 ..					91,60-94,60	10,50-17,34
7,10 ..	29,00	0,90*	39,80	6,40	93,70	18,80
7,30 ..	29,55	3,40				
9,10 ...	30,40	2,20	40,90	6,40		
9,20 ...					102,50	20,30
9,50 ...			40,70	8,00*		
10,15 ...	30,50	3,00				
11,30 ...			41,80	6,70		
15,30 ...	30,60	5,50	40,45	8,60*		
17,05 ...					154,50	22,50*
20,15 ...	30,60	4,40*				
24,15 ...	30,85	6,00*	40,90	9,32*		
25,10 ...			42,80	9,50		
32,50 ...					216,70	24,00*
48,00 ...	29,40	5,50*	42,15	10,54*		

Les chiffres marqués d'un astérisque font partie d'une même série d'expériences.

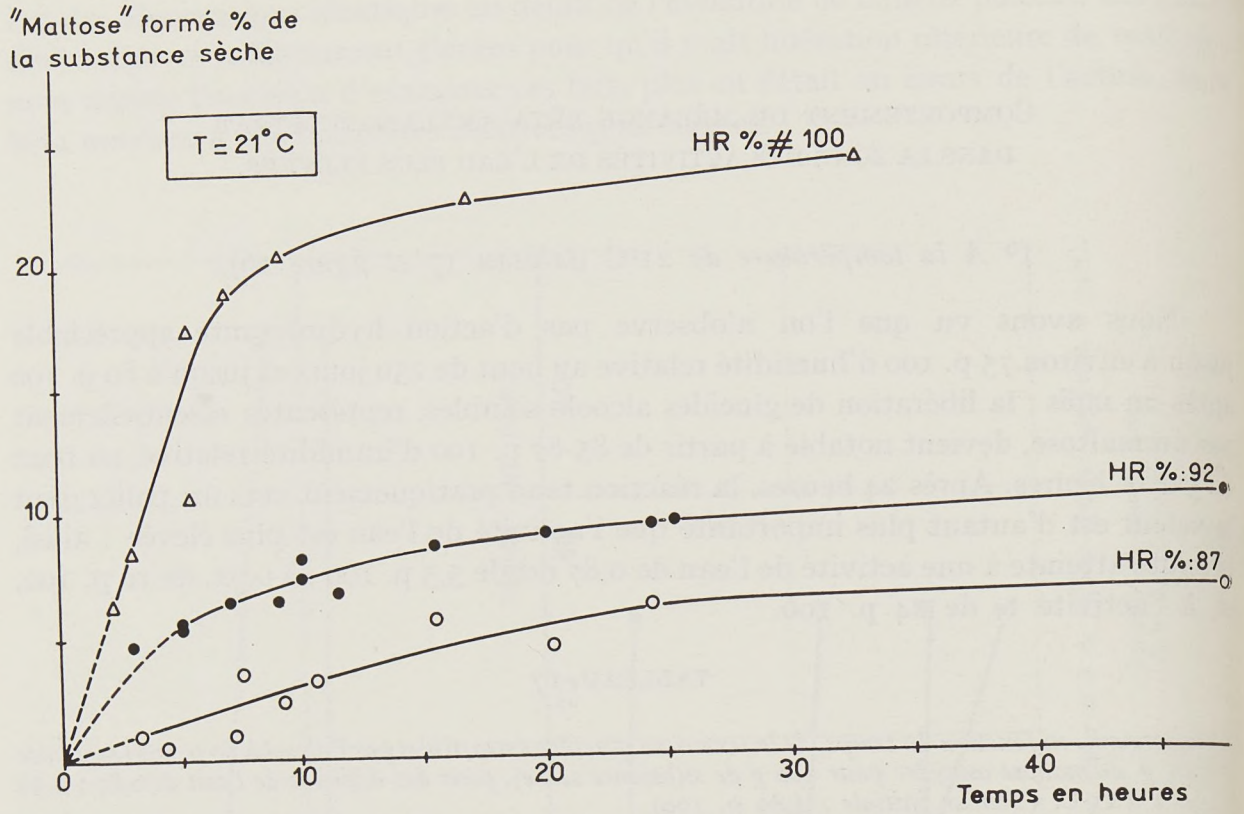


FIG. 16. — *Évolution en fonction du temps de la teneur en constituants alcoolo-solubles, de milieux placés à diverses activités de l'eau à* 21°C.

2° *A la température de* 31°C (*tableaux* 18 *et* 19, *figures* 17 *et* 18).

Nous avons observé le même genre d'évolution qu'à 21°C à partir d'une humidité relative de 73 p. 100 ; la vitesse de libération des produits alcoolo-solubles est plus ou moins rapide et leur valeur limite est d'autant plus élevée que l'humidité relative

TABLEAU 18

Glucides extractibles par l'alcool à 80 p. 100 (exprimés en g de maltose anhydre pour 100 g de produit sec) en fonction du temps et pour différentes activités de l'eau à 31°C.

Temps en heures	Activités de l'eau					
	0,841		0,842		0,85	
	H_2O p. 100 de la substance sèche	Maltose	H_2O p. 100 de la substance sèche	Maltose	H_2O p. 100 de la substance sèche	Maltose
0		2,60		2,60		2,60
2,00 ...	25,00	3,00	23,30	3,00	24,80	5,40
3,20 ...	27,10	2,60	23,80	2,80		
4,00 ...					25,60	4,30
4,40 ...	27,00	2,80				
6,20 ...	28,10	2,50				
7,00 ...					26,70	3,70
7,25 ...			25,60	2,90		
10,00 ...	31,60	2,70				
11,00 ...					27,40	5,10
11,45 ...			26,30	4,85		

TABLEAU 18 *(suite)*

Temps en heures	Activités de l'eau					
	0,841		0,842		0,85	
	H_2O p. 100 de la substance sèche	Maltose	H_2O p. 100 de la substance sèche	Maltose	H_2O p. 100 de la substance sèche	Maltose
12,10 ...	29,20	2,30				
15,00 ...	30,20	2,40				
16,00 ...			25,50	5,50		
21,00 ...	30,40	2,80	25,80	6,90		
25,00 ...					30,00	9,80
26,15 ...	31,10	3,40	24,00	7,80		
33,15 ...			24,30	8,00		
34,15 ...	31,60	4,70				
50,00 ...			25,25	8,20		
120			26,10	8,10	26,10	10,40
145					26,50	10,40
170					26,40	10,20
275	31,00	8,70				
420	31,00	9,40				

TABLEAU 19

Accroissement, en fonction du temps, de la teneur en glucides extractibles par l'alcool à 80 *p.* 100 (*exprimée en g de maltose anhydre pour* 100 *g de substance sèche*), *pour des activités de l'eau de* 0,841-0,85-0,92 *et* 1 *à* 31°C. (*Teneur initiale :* 2,60 *p.* 100).

Temps en heures	Activités de l'eau							
	0,841		0,85		0,92		1,00 ≠	
	H_2O p. 100 de la substance sèche	« Maltose » formé	H_2O p. 100 de la substance sèche	« Maltose » formé	H_2O p. 100 de la substance sèche	« Maltose » formé	H_2O p. 100 de la substance sèche	« Maltose » formé
1,45					40,20	9,75		
2,10			32,40	3,00				
3,35					57,50	13,40		
4,00			37,60	7,80				
4,20							73,85	16,89
5,20							84,40	19,30
6,00					78,50	17,70		
6,25							104,80	21,00
7,00					73,60	17,20		
7,35	25,60	0,30	52,10	10,50				
8,20					75,00	17,00		
9,20					71,60	18,00		
10,10					78,00	16,20		
10,30			47,00	12,20				
11,45	26,30	2,25						
14,40							164,20	33,30
15,10			53,10	14,10				
16,00	25,50	2,90						
20,45			44,50	13,30				
21,00	25,80	4,30						
24,20							353,50	38,00
25,20					101,70	21,40		
26,00			44,00	13,40				
26,15	24,00	5,20						
50,00	25,25	5,60						
190,00			43,60	13,40				

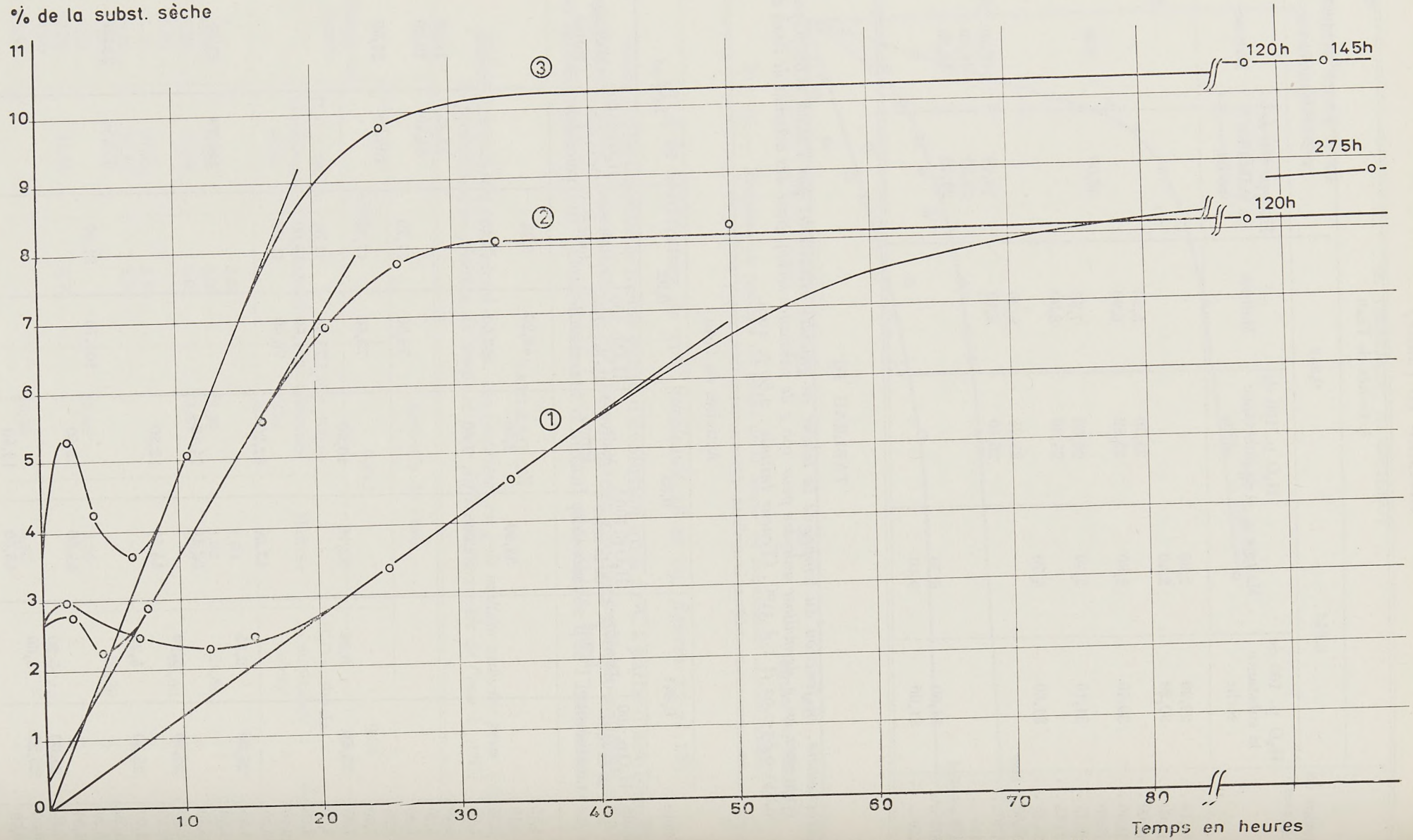


FIG. 17. — *Évolution de la teneur en constituants alcoolo-solubles de milieux placés à 31°C à des H. R. de :*
— 84 p. 100 (courbe 1)
— 94 p. 100 (courbe 2)

est plus importante. Cependant, pour des humidités relatives situées dans la zone de 84-85 p. 100, la reproductibilité des résultats entre deux séries d'expériences est relativement faible en raison des difficultés expérimentales que nous avons précédemment exposées et de la rapide évolution du phénomène dans cette zone d'activité de l'eau.

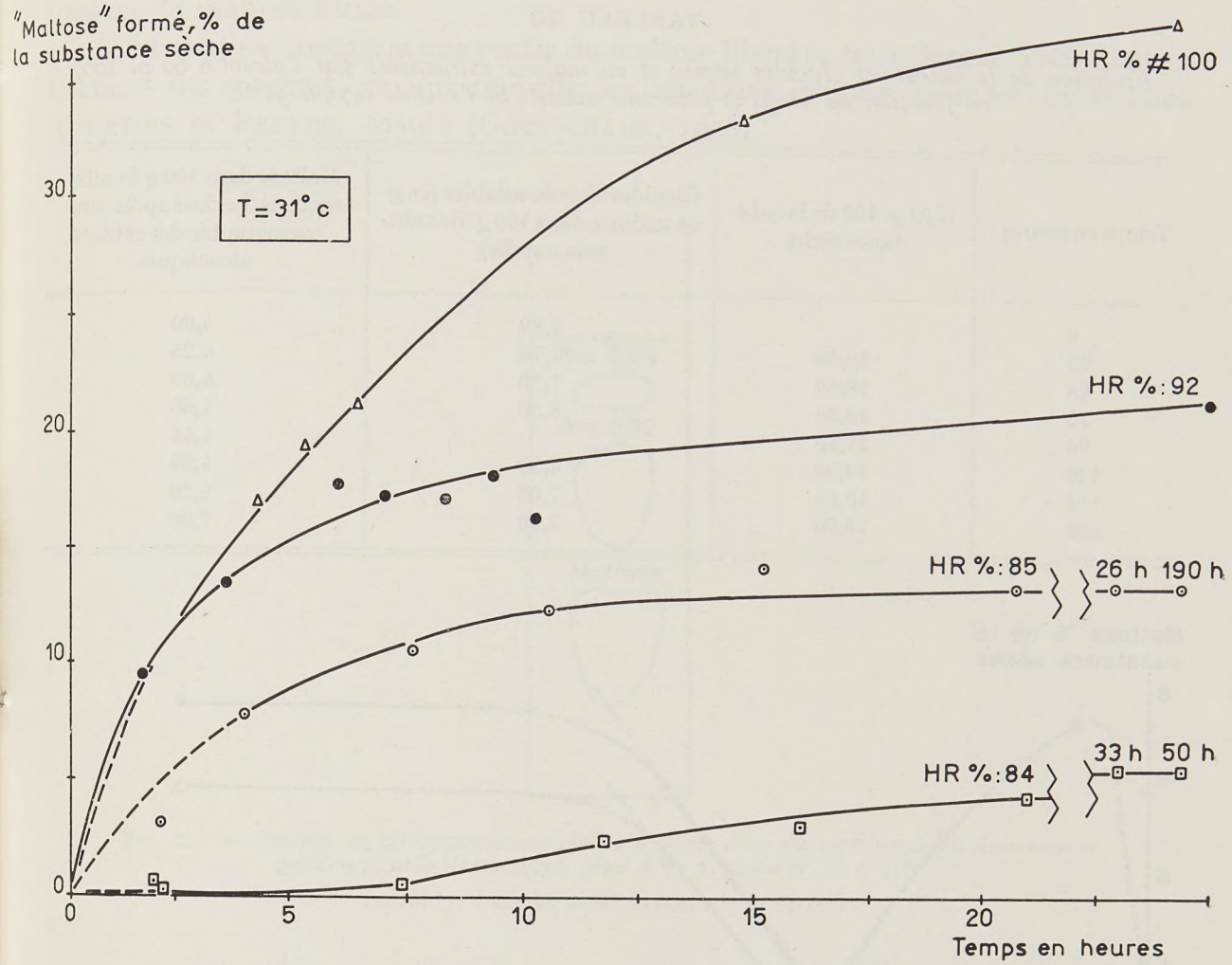


FIG. 18. — *Évolution en fonction du temps, de la teneur en constituants alcoolo-solubles de milieux placés à diverses activités de l'eau à* 31°C.

EXAMEN APPROFONDI DES PHÉNOMÈNES OBSERVÉS

1° *Évolution de la fraction alcoolo-soluble entre* 0,73 *et* 0,85 *d'activité de l'eau.*

Dans la zone de transition située entre 73 et 85 p. 100 d'humidité relative, on observe fréquemment, à 31°C, au début de l'évolution du milieu bêta amylase-substrat, le même type de phénomène que celui décrit pour les faibles activités de l'eau. Il se produit d'abord un accroissement de la fraction alcoolo-soluble, suivi d'une diminution de celle-ci, puis un nouvel accroissement aboutissant à un palier (tableau 18 et figure 17) ; il est remarquable de constater que :

— d'une part, la tangente au point d'inflexion de la partie de la courbe correspondant au deuxième accroissement passe pratiquement par l'origine ;

— d'autre part, la quantité de maltose dosée après séparation chromatographique s'accroît très lentement pendant que la teneur en produits alcoolo-solubles passe par un maximum, puis, à partir du point d'inflexion de la deuxième portion de la courbe, augmente et tend vers une valeur limite, représentant alors la quasi-totalité des produits alcoolo-solubles (tableau 20 et figure 19).

TABLEAU 20

Évolution de la teneur en glucides totaux et en maltose extractibles par l'alcool à 80 p. 100, en fonction du temps et pour une activité de l'eau de 0,73 à 31°C.

Temps en heures	H_2O p. 100 de la substance sèche	Glucides alcoolo solubles (en g de maltose dans 100 g. de substance sèche)	Maltose dans 100 g de substance sèche dosé après chromatographie des extraits alcooliques
0		4,80	4,00
24	19,20	7,70	4,25
48	18,60	7,20	4,60
72	19,30	6,50	4,60
96	21,40		4,45
120	19,90	4,90	4,80
168	18,60	7,00	6,20
336	18,70	7,90	7,00

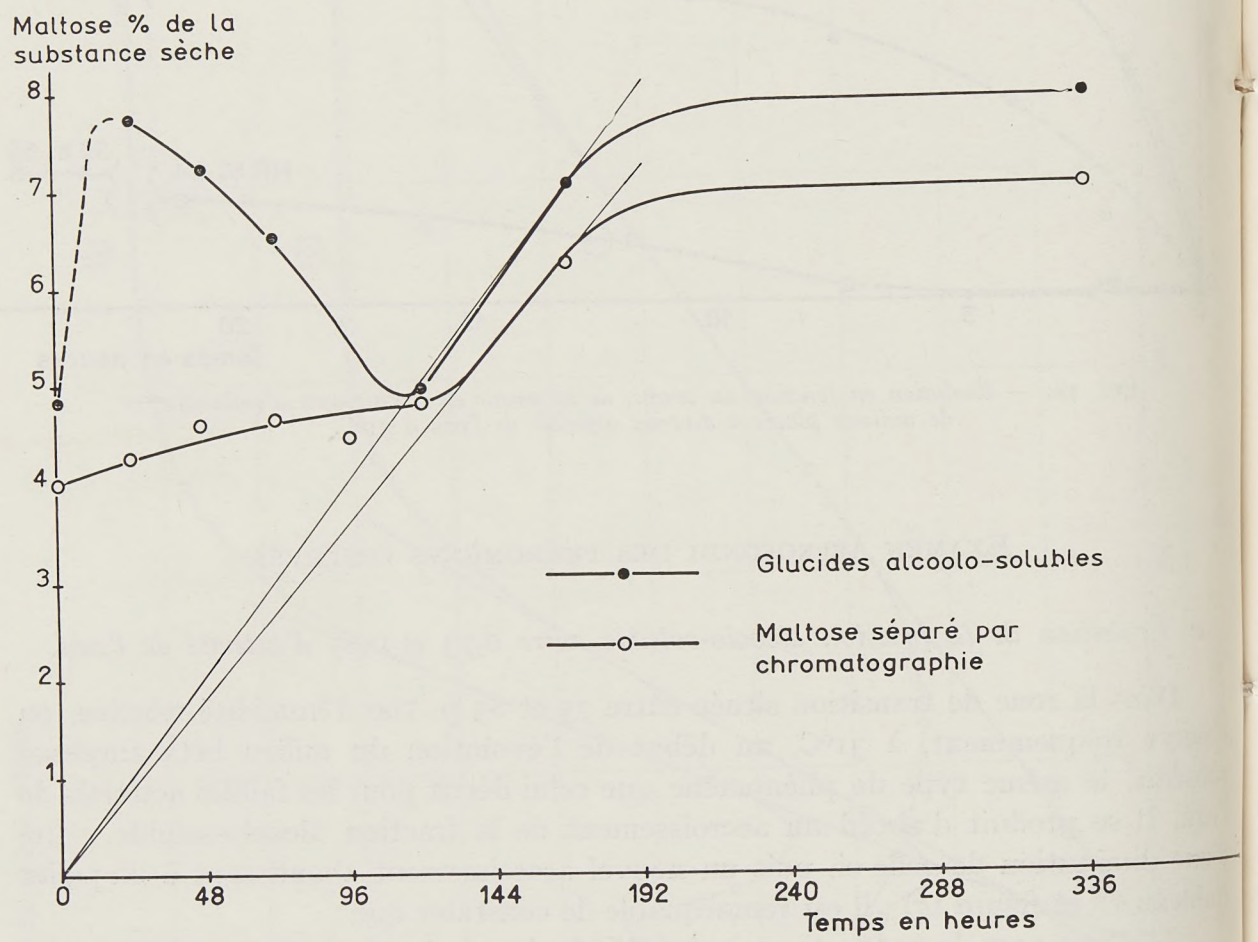


FIG. 19. — *Evolution en glucides totaux et en maltose, d'un milieu placé à une activité de l'eau de 0.73 à 21°C*

Ces résultats, bien que fragmentaires, suggèrent qu'au début de l'évolution du milieu, la libération de maltose serait proportionnelle au temps, mais qu'à ce phénomène se superposeraient des réactions plus complexes, comprenant en particulier :

— une libération de produits alcoolo-solubles (q) autres que le maltose, au début de la formation de ce diholoside ;

— puis, une insolubilisation de cette fraction glucidique (q) ainsi que d'une fraction du maltose formé.

Tout se passe comme si une partie du maltose libéré se recondensait avec d'autres fractions du substrat, ce qui rappelle les réactions décrites pour les transférases (Courtois et Perles, 1959) ; (Gottschalk, 1958).

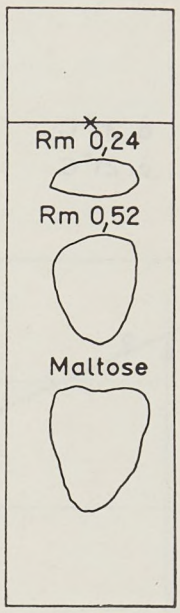


Fig. 20. — *Schéma de chromatogramme obtenu à partir d'un extrait éthanolique d'un milieu amidon soluble-bêta-amylase placé à 73 p. 100 d'H. R. à 31°C.*
Solvant : butanol-acide acétique-eau (4-1-5)

Par chromatographie, il a été possible d'isoler, en plus du maltose, au moins deux composés de Rf très faible et assez rapprochés l'un de l'autre (figure 20). Ces substances réagissent lentement avec le nitrate d'argent ammoniacal ; avec le phtalate d'aniline, la réaction est décelable en lumière ultraviolette et leur révélation est particulièrement nette avec le réactif périodate-benzidine. De ces deux substances, l'une (Rf = 0,52), quantitativement la plus importante, libère, par hydrolyse à l'acide sulfurique, des acides aminés et du glucose. Nous avons observé un constituant présentant les mêmes caractéristiques dans l'extrait alcoolique de la préparation de bêta-amylase, mais il n'a pas été possible de suivre quantitativement son évolution au cours de l'amylolyse dans les milieux peu hydratés.

Il est souhaitable qu'une analyse plus détaillée de ces phénomènes soit entreprise, afin de confirmer la présence du complexe enzyme-substrat dont l'analyse chromatographique suggère l'existence, et de suivre l'évolution de ce produit en cours d'amylolyse. Nous nous proposons de reprendre ultérieurement cette étude.

2° Amplitude de l'amylolyse en fonction de l'activité de l'eau.

Dans la figure 21, nous avons porté, en fonction de l'humidité relative, pour les températures de 21 et 31°C, les quantités maximales de glucides alcoolo-solubles formés correspondant aux paliers des courbes d'évolution dans le temps de la teneur en maltose du milieu.

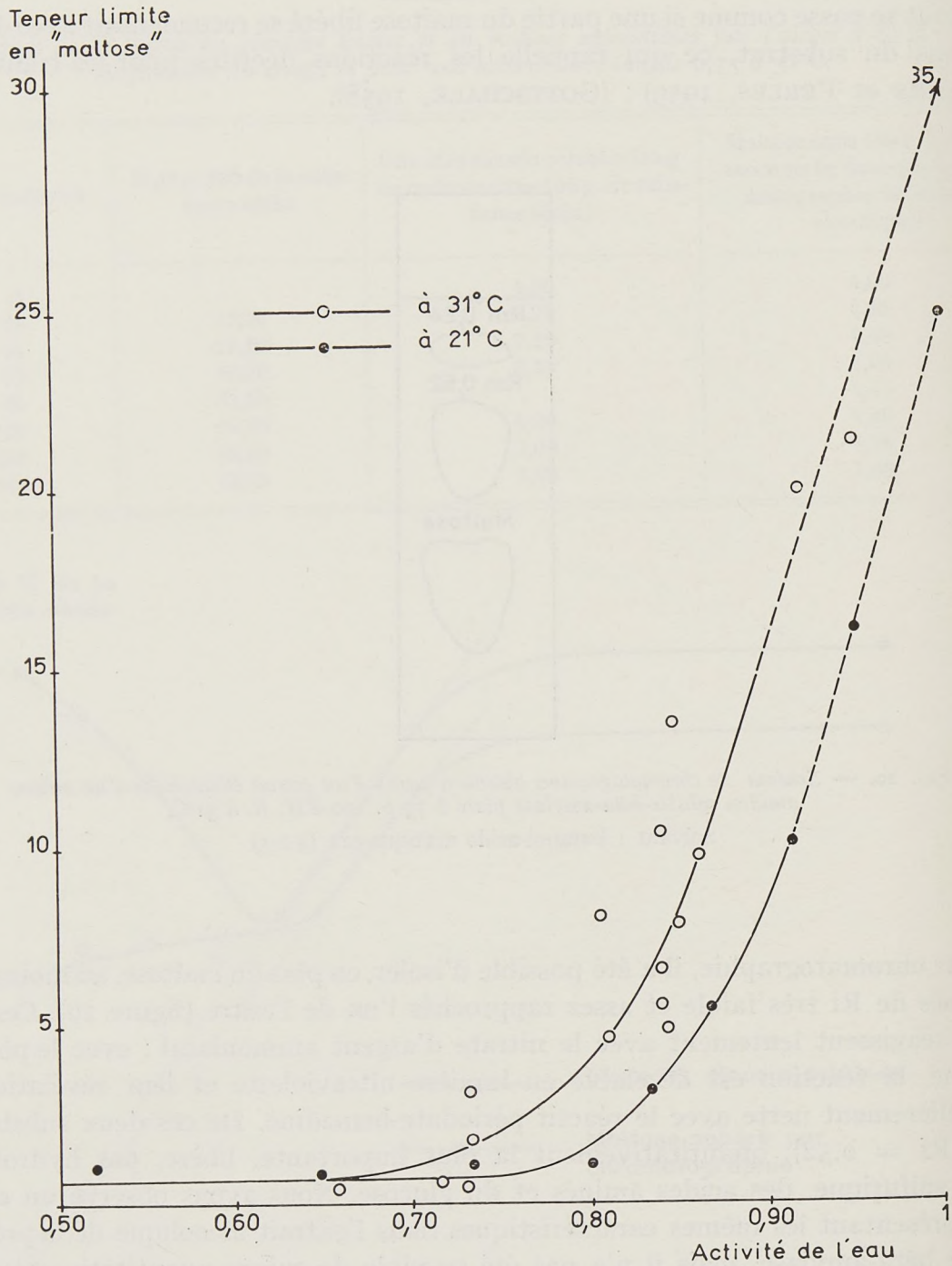


FIG. 21 — *Quantités maximales de glucides alcoolo-solubles formés en fonction de l'activité de l'eau à 21 et 31°C.*

Aux faibles humidités relatives, la quantité de produits formés, correspondant à la réaction particulière que nous avons indiquée, est peu importante et reste sensiblement constante ; ce n'est que vers 75 p. 100 à 21°C et 68 p. 100 à 31°C que se

manifeste la bêta-amylolyse proprement dite. Au-dessus de ces humidités relatives on obtient ensuite, en première approximation, deux courbes d'allure régulière s'accroissant très rapidement.

Le phénomène se présente différemment si, au lieu de porter le maltose formé en fonction de l'activité de l'eau, on l'exprime par rapport à la quantité « d'eau solvante » présente dans le milieu [1] (figure 22). La teneur limite en maltose formé s'accroît rapidement pour les 10 premiers p. 100 « d'eau solvante » ; l'évolution est ensuite approximativement linéaire, au moins jusqu'à une quantité « d'eau solvante » voisine de 100 p. 100.

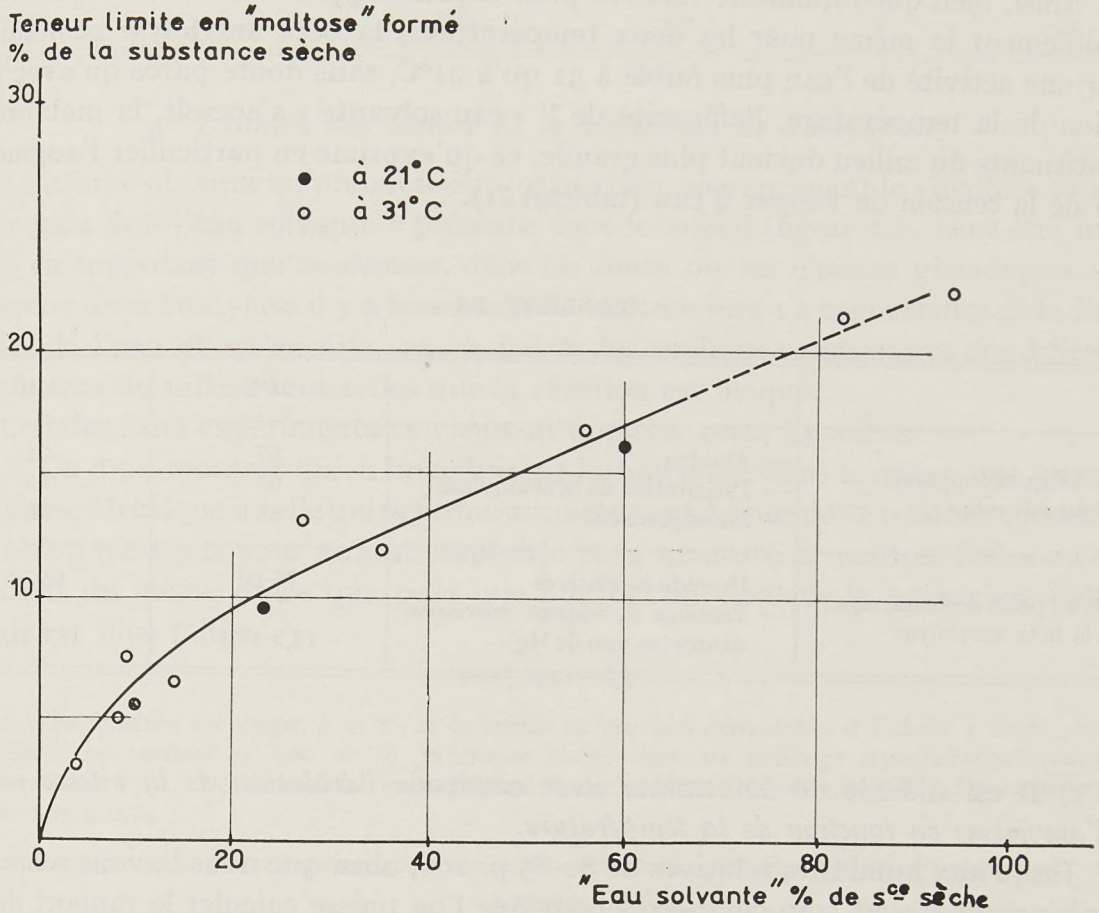


FIG. 22. — *Teneur limite en « maltose » formé, en fonction de la teneur en « eau solvante » du milieu, à 21 et 31°C.*

Tout se passe comme si une quantité « d'eau solvante » de plus en plus importante devenait nécessaire pour libérer une unité de maltose au fur et à mesure que la quantité de maltose s'accroît dans le milieu.

3° *Influence de la température sur l'évolution de l'amylolyse.*

a) Il convient de remarquer tout d'abord que la *relation entre la teneur limite en maltose formé et « l'eau solvante » semble être sensiblement la même à 21 et à 31° C*, au moins jusqu'à 90-95 p. 100 d'humidité relative (fig. 22), ce qui tendrait à indiquer

[1] Cette teneur en eau a été estimée approximativement en partant de l'hypothèse émise par GUILBOT et LINDENBERG (1960) et en calculant l'eau non solvante par la règle des mélanges, à partir des courbes de sorption du milieu amidon soluble-bêta amylase inactivée et du maltose, pour autant que cela a été possible.

que la répercussion de la température sur la quantité maximale de glucides alcoolosolubles formés serait comparable à l'influence de ce facteur sur la quantité « d'eau solvante » présente dans ce milieu complexe.

b) par ailleurs, *l'humidité relative à laquelle s'effectue le démarrage de la réaction est plus faible à* 31 *qu'à* 21°C. En effet, si l'on compare à ces deux températures, les humidités relatives pour lesquelles on observe le point à partir duquel apparaît « l'eau solvante » sur les courbes de sorption de l'amidon, de la bêta amylase et de leur mélange (figures 14-15 et 17), on aboutit aux résultats indiqués dans le tableau 21.

Ainsi, bien que l'humidité relative pour laquelle apparaisse l'eau « solvante » soit sensiblement la même pour les deux températures, la bêta amylolyse se manifeste pour une activité de l'eau plus faible à 31 qu'à 21°C, sans doute parce qu'avec l'élévation de la température, l'efficacité de l' « eau solvante » s'accroît, la mobilité des constituants du milieu devient plus grande, ce qu'exprime en particulier l'augmentation de la tension de vapeur d'eau (tableau 21).

TABLEAU 21

		21°C	31°C
H. R. à laquelle apparaît « l'eau solvante »	— Amidon	67	72
	— Préparation de bêta amylase	65	65
	— Mélange inactif	66	68
H. R. au point de démarrage de la bêta amylolyse	— Humidités relatives	75-80	65-70
	— Tensions de vapeur correspondantes (en mm de Hg)	13,9-14,8	21,7-23,3

c) Il est difficile de déterminer avec certitude *l'évolution de la vitesse initiale de l'amylolyse en fonction de la température.*

Jusqu'aux humidités relatives de 80-85 p. 100, ainsi que nous l'avons remarqué, les phénomènes sont trop complexes pour que l'on puisse calculer le rapport des vitesses aux deux températures.

Aux humidités relatives voisines de 100 p. 100, les difficultés expérimentales sont également trop importantes pour qu'un calcul puisse être entrepris à partir des résultats obtenus.

Dans la zone intermédiaire, aux humidités relatives voisines de 90 p. 100, nous avons essayé de calculer le Q_{10} de la réaction pour des milieux placés, soit à même activité de l'eau, voisine de 0,90, soit à même teneur en eau, compte tenu que cette dernière évolue progressivement en cours de réaction pour l'humidité relative considérée.

Le tableau 22 indique les résultats de ce calcul : le Q_{10} obtenu est voisin dans les deux cas et comparable à ceux habituellement signalés pour les réactions enzymatiques en solution diluée, ce qui laisse penser qu'au moins pour ces humidités relatives, l'influence de la température est sensiblement la même que dans les milieux très hydratés.

TABLEAU 22

Détermination du Q_{10} de la bêta amylolyse dans les milieux placés vers 90 p. 100 H. R.

Température (°C)	Activité de l'eau	Temps en minutes	H_2O p. 100 de la substance sèche	« Maltose » formé, p. 100 de la substance sèche	Q_{10}
21	0,91	300	38,5	10	2,4
31	0,92	300	70,0	24	
21	0,91	300	38,5	10	
31	0,92	105	38,0	9	2,6

4° *Examen des causes de la limitation de l'amylolyse.*

La courbe obtenue en première approximation, en exprimant le « maltose » formé en fonction de « l'eau solvante » présente dans le milieu (figure 22), peut être interprétée en supposant que *localement*, dans les zones où les chaînes glucidiques sont en contact avec l'amylase il y a formation de maltose jusqu'à concurrence de la disponibilité de l'eau et qu'ensuite, en ce point, les mobilités respectives des différents constituants du milieu sont telles que la réaction est bloquée.

Certains faits expérimentaux viennent appuyer cette hypothèse :

a) On a pu montrer qu'en introduisant initialement dans le milieu une quantité de maltose identique à celle qui se forme normalement à l'humidité relative considérée, la réaction n'est pas pour autant empêchée et la quantité de maltose formé est sensiblement du même ordre que celle que l'on obtient lorsque la teneur en maltose initiale est plus faible.

TABLEAU 23

Évolution en fonction du temps, à 31°C, de la teneur en glucides extractibles à l'alcool à 80 p. 100 (exprimée en maltose p. 100 de la substance sèche) dans un mélange cryodéshydraté amidon-β amylase à 15 p. 100 de maltose, en sorption à des activités de l'eau de 0,80 et de 0,85 ; en désorption de 0,80 à 0,74.

Temps en heures	Activités de l'eau									
	0,85 (*)		0,80 (sorption)				0,74 (désorption)			
	H_2O p. 100 de la substance sèche	« Maltose » formé	N° de l'échantillon	Temps en heures	H_2O p. 100 de la substance sèche	« Maltose » formé	N° de l'échantillon	Temps en heures	H_2O p. 100 de la substance sèche	« Maltose » formé
			1	10,30	26,70	10,80	1	12,00	28,80	10,50
3,15	36,60	5,75	2	10,30	37.20	8,50	2	24,00	28,50	8,60
6,15	47,90	10,40	3	25,00	32,20	8,70	3	6,00	22,10	8,20
9,00	59,30	13,00								
24,00	59,30	13,70								
96,00	59,30	16,10								
240,00	59,30	18,20								

(*) expérience effectuée sur un seul échantillon, (comparer aux valeurs données dans la colonne 3 du tableau 18).

b) De même, si, après avoir atteint à une humidité relative donnée sa teneur limite en maltose, le milieu est cryodéshydraté et sa structure modifiée par broyage, on observe, après remise en sorption à une H. R. identique ou légèrement inférieure à la précédente, la formation d'une nouvelle quantité de maltose (tableau 24). Par contre, dans les mêmes milieux séchés et non broyés, l'amylolyse se manifeste d'une façon beaucoup moins importante.

TABLEAU 24

Évolution de la quantité de « maltose » d'un milieu ayant atteint sa teneur limite en « maltose » à une humidité relative donnée et replacé à une H. R. égale ou inférieure, après dessiccation suivie ou non d'un broyage.

Expérience I. — Milieu de teneur totale en « maltose » égale à 15,10 p. 100 (10,30 p. 100 de formé) et 26,5 p. 100 d'eau à 84 p. 100 d'humidité relative à 31°C.

a) — Après séchage et remise à 84 p. 100 d'humidité relative à 31°C.

Temps en heures	H_2O p. 100 de la substance sèche	Maltose total (en g p. 100 de la substance sèche)	Maltose formé (g p. 100 de la substance sèche)
22	27,20	14,40	
62	31,20	15,40	0,30
113	32,00	15,70	0,60

b) — Après séchage, *broyage* et remise à 84 p. 100 d'humidité relative à 31°C.

113	84,10	29,70	14,60

Expérience II. — Milieu de teneur totale en « maltose » égale à 9,60 p. 100 (4,80 p. 100 de formé) et 25 p. 100 d'eau à 83 p. 100 d'humidité relative à 31°C.

a) — Après séchage et remise à 81 p. 100 d'humidité relative à 31°C.

170	26,10	13,30	3,70

b) — Après séchage, broyage et remise à 81 p. 100 d'humidité relative à 31°C.

9	37,20	15,30	5,60
25	78,90	25,20	15,60
32	35,40	17,60	8,00
170	24,80	15,40	5,80

Ces résultats suggèrent que dans des milieux quasi solides, dans lesquels les constituants présentent très peu de mobilité, il y a lieu de considérer le phénomène d'amylolyse comme une dégradation topochimique.

Au cours de la préparation du mélange enzyme-substrat à l'état sec, on peut supposer que l'enzyme est localisé sur des points bien déterminés des chaînes glucosidiques. Dans la mesure où cette position sera compatible avec la libération du maltose, celle-ci se produira à partir d'une certaine activité de l'eau. En raison de la rigidité du milieu, on aura alors localement un accroissement de la concentration en maltose, une diminution de la disponibilité de l'eau et un déplacement très limité de l'enzyme par rapport à la chaîne du substrat, ce qui peut expliquer les résultats obtenus.

En effet, dans ces conditions, l'addition de maltose en solution avant déshydratation du mélange ne peut gêner de façon importante l'amylolyse puisque c'est la

concentration locale en maltose qui intervient et non la concentration globale (à supposer qu'une forte concentration en maltose puisse être inhibitrice).

En outre, lorsque après avoir atteint l'équilibre d'amylolyse pour une humidité relative donnée on modifie, par séchage suivi d'un broyage, la texture du milieu et la répartition de l'enzyme vis-à-vis des chaînes glucosidiques, l'amylolyse se manifeste à nouveau, les concentrations locales des différents constituants se trouvant ainsi modifiées.

Il est du reste bien difficile de se rendre compte de l'évolution précise de tels milieux, le maltose étant susceptible d'exister à l'état amorphe ou de cristalliser dans certaines conditions et les chaînes d'amidon pouvant se réorganiser (rétrogradation) ; phénomènes qui modifient l'affinité pour l'eau du système (cf. tableau 13) et l'évolution ultérieure.

5° *Influence du mode d'hydratation du milieu sur la vitesse et la limite de la réaction.*

Nous avons, par ailleurs, essayé d'examiner les répercussions qu'apportait le mode d'incorporation de l'eau au milieu pour l'amener à une activité de l'eau voisine de 1. D'après les résultats rassemblés dans le tableau 25, la vitesse d'amylolyse et la teneur limite en maltose du milieu sont très sensiblement plus importantes si l'eau est ajoutée à l'état liquide au lieu d'être incorporée par l'intermédiaire de la phase

TABLEAU 25

Accroissement, en fonction du temps, de la teneur en glucides extractibles par l'alcool à 80 p. 100 (exprimée en g de maltose dans 100 g de substance sèche) pour une activité de l'eau voisine de 1, à 31°C. (Teneur initiale 4,80).

Comparaison des résultats obtenus par hydratation en phase vapeur et en phase liquide,

Temps en heures	Hydratation en phase vapeur		Hydratation en phase liquide			
			Mélange pâteux		Mélange liquide (90 mg de mélange amidon-β amylase + 12 ml H_2O)	
					Milieu non tamponné	Milieu tamponné pH 4,8
	H_2O p. 100 de la substance sèche	« Maltose » formé	H_2O p. 100 de de la substance sèche	« Maltose » formé	« Maltose » formé	
0,30						67,80
1,00						60,20
2,15	33,50	4,15				63,70
3,00	46,00	6,10	176	45,20		66,60
4,20	73,85	16,90				68,70
5,20	84,40	19,30				
6,25	104,80	21,00				
14,40	164,20	33,30	176	56,30-56,00 48,00	65,00	70,70
20,20	203,50	29,54	176	42,00		
24,20	353,50	38,00				
42,00					63,60	
99,00						65,10

vapeur. Sans doute ceci est-il dû au fait que l'équilibre hydrique s'effectue très progressivement en phase vapeur mais n'est obtenu, après addition d'eau, que par une redistribution entre des fractions trop hydratées et d'autres qui le sont insuffisamment.

De toutes façons, on voit dans le tableau 25, que dans les milieux pâteux, quelle que soit la façon dont se fait l'hydratation, on reste en dessous de la teneur en maltose existant à l'équilibre en solution diluée.

Influence de la présence de cristalloïdes dans le milieu sur les conditions de l'amylolyse.

Ainsi que nous l'avons indiqué, les préparations enzymatiques utilisées sont stabilisées par une quantité relativement importante de sels, en particulier de sulfate de sodium. De plus, des produits solubles sont formés au cours de l'amylolyse. Ces différentes substances risquent de modifier sensiblement la courbe de sorption du milieu et, par conséquent, la quantité d' "eau solvante", selon l'humidité relative à laquelle se forme leur solution saturée. C'est dans le but de nous faire une opinion sur l'importance de cette action que nous avons procédé à un certain nombre d'expériences.

1° *Étude du comportement de milieux constitués d'amidon soluble et de bêta amylase dialysée* (1).

Sur de tels milieux, d'activité enzymatique comparable à celle existant dans les milieux préparés avec l'amylase non dialysée, on observe, ainsi que le montre le tableau 26, un démarrage de la réaction enzymatique pour des humidités relatives

TABLEAU 26

Accroissement, en fonction du temps, de la teneur en glucides extractibles par l'alcool à 80 p. 100 (exprimée en g de maltose dans 100 g de substance sèche), dans un mélange amidon-amylase dialysée (activité 50,7) pour des activités de l'eau de 0,80-0,85 et 0,90 à 31°C (Teneur initiale 0,70 p. 100).

Temps en heures	Activités de l'eau					
	0,80		0,85		0,90	
	H_2O p. 100 de la substance sèche	« Maltose » formé	H_2O p. 100 de la substance sèche	« Maltose » formé	H_2O p. 100 de la substance sèche	« Maltose » formé
6,00	20,40	0,60				
6,10			23,60	1,30		
6,25					29,00	12,70
9,25	20,40	0,40				
10,00			23,50	0,90	29,00	10,60
25,20	20,00	0,15				
25,35			25,40	0,50		
49,15	20,30	0,10	25,30	0,70		
49,30					31,20	12,90
312,00	20,25	0,60	25,60	1,10		
552,00	26,90	1,00				

(1) Remarquons que dans ces milieux, pour des activités de l'eau de 0,80 et 0,85, on note encore une évolution des produits de dégradation alcoolo-solubles en deux stades avec passage par un maximum, ce qui montre que le phénomène antérieurement observé n'est pas dû à la présence de sels.

sensiblement plus élevées (80-85 au lieu de 65-70). Ceci provient vraisemblablement du fait que dans le mélange contenant des sels, la quantité « d'eau solvante » pour une même humidité relative est plus importante que dans l'autre cas.

2° *Étude du comportement de milieux amidon soluble-bêta amylase, additionnés de divers cristalloïdes (tableau 27).*

Afin de savoir si c'est l'existence d'une certaine quantité d'eau solvante, plus que l'activité de l'eau, qui intervient sur le démarrage de l'action enzymatique, nous avons ajouté au milieu réactionnel diverses substances hygroscopiques. Notre choix a porté, d'une part, sur le glycérol dont la courbe de sorption s'accroît très rapidement au-delà de 25 p. 100 d'humidité relative (figure 23), d'autre part, sur des sels formant des solutions saturées à des humidités relatives inférieures ou égales à celles pour lesquelles on a observé l'amylolyse dans le milieu précédemment étudié : le chlorure de lithium, le bromure de sodium et le bromure de potassium, dont les solutions saturées ont des tensions relatives de vapeur d'eau respectivement de l'ordre de 11-57 et 82 p. 100 (ROCKLAND, 1960).

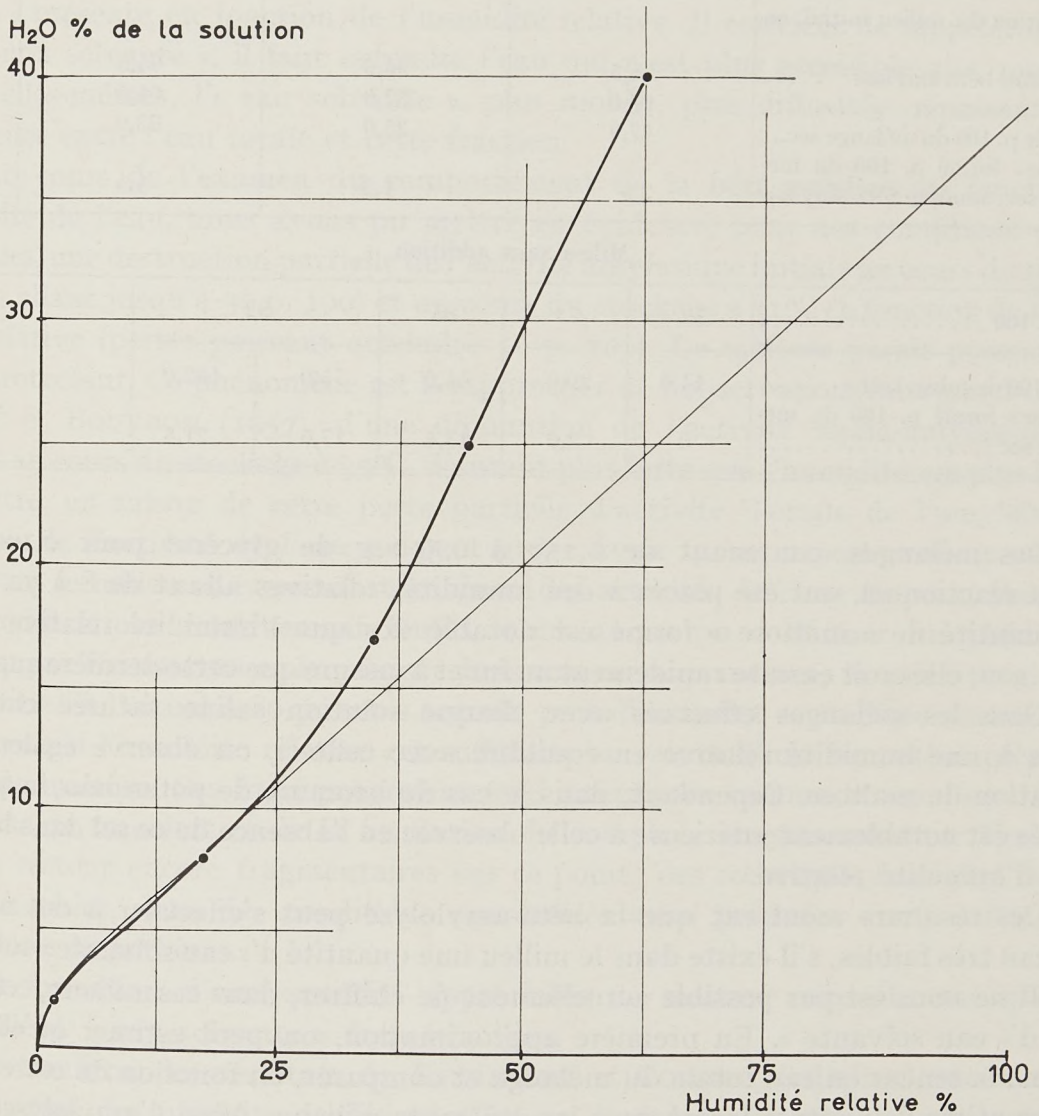


FIG. 23. — *Isotherme de sorption de glycérol à* 31°C (BEILSTEINS).

TABLEAU 27

Influence de divers cristalloïdes sur le comportement de milieux amidon soluble-bêta amylase à diverses humidités relatives à 31°C.

Milieu additionné de glycérol

H. R. p. 100	20,5	26,5	35	40	47	52	72
Composition du milieu initial, en mg :							
— Amidon-bêta amylase	95,5	95,4	95,0	93,4	94,0	93,4	94,4
— Glycérol	281,0	125,0	482,0	138,6	367,0	152,2	237,5
Eau fixée p. 100 du mélange sec	7,7	6,3	10,0	13,6	20,0	19,7	69,0
« Maltose » formé p. 100 du mélange sec amidon-bêta amylase	0,6	0,6	1,8	11,2	24,6	22,2	35,5

Milieu additionné de :

	Chlorure de lithium	Bromure de sodium	Bromure de potassium
H. R. p. 100	11	57	82
Composition du milieu initial, en mg			
— Amidon-bêta amylase	94,5	96,6	94,5
— Sel	90,0	57,0	64,5
Eau fixée p. 100 du mélange sec	47,0	35,0	73,0
« Maltose » formé p. 100 du mélange sec, amidon-bêta amylase	2,5	1,2	4,4

Milieu sans addition

H. R. p. 100	52	73	85	92	
Eau p. 100 de subst. sèche	14,0	20,0	44,0	75,0	102,0
« Maltose » formé p. 100 du mélange sec	0	3,0	13,4	17,5	21,4

Des mélanges, contenant de 0,150 à 0,500 g de glycérol pour 0,100 g de milieu réactionnel, ont été placés à des humidités relatives allant de 8 à 72 p. 100. La quantité de « maltose » formé est notable dès que l'humidité relative atteint 35 p. 100 ; elle croît ensuite rapidement au fur et à mesure que cette dernière augmente.

Dans les mélanges effectués avec chaque solution saline saturée choisie et placés à une humidité relative en équilibre avec celle-ci, on observe également la formation de maltose. Cependant, dans le cas du bromure de potassium, la quantité formée est notablement inférieure à celle observée en l'absence de ce sel dans la même zone d'humidité relative.

Ces résultats montrent que la bêta-amylolyse peut s'effectuer à des activités de l'eau très faibles, s'il existe dans le milieu une quantité d'« eau solvante » suffisante.

Il ne nous est pas possible actuellement de chiffrer, dans ces milieux, cette fraction d'« eau solvante ». En première approximation, on peut estimer qu'elle varie comme la teneur en eau totale du mélange et comparer, en fonction de cette valeur, les quantités de maltose formé dans les différents milieux. Ainsi, l'amylolyse en présence de glycérol se manifeste pour une teneur en eau totale plus faible et de façon

plus rapide que sans glycérol. Par contre en présence des solutions saturées de sels, la quantité de maltose formé pour une même teneur en eau est nettement plus faible que dans le milieu initial. Peut-être faut-il invoquer l'influence inhibitrice des sels utilisés et dans le cas du glycérol, la mobilité supplémentaire que cette substance confère au milieu. Il serait souhaitable d'entreprendre d'autres essais pour vérifier ces hypothèses.

Conclusions

La comparaison des isothermes de sorption d'eau des milieux enzyme-substrat et de leurs constituants a permis de préciser l'affinité pour l'eau de ces substances et sa modification au cours de leur mélange, du remaniement de leur structure (maltose amorphe ou cristallisé) et des processus de dégradation.

D'après l'interprétation de Guilbot et Lindenberg, on peut distinguer à partir de ces courbes deux formes d'eau : une « eau non solvante » fortement liée aux substances, et une « eau solvante » apparaissant à des activités de l'eau variables selon les produits, pour lesquelles la courbe de sorption se sépare de sa partie linéaire. Dans la mesure du possible, nous avons essayé de chiffrer la quantité d' « eau solvante » présente en fonction de l'humidité relative. Il convient de rappeler que par « eau non solvante », il faut entendre l'eau qui n'est plus accessible aux molécules d'eau elles-mêmes, l'« eau solvante », plus mobile, plus diffusible, représentant la différence entre l'eau totale et cette fraction.

Au cours de l'examen du comportement de la bêta-amylase en fonction de l'activité de l'eau, nous avons pu mettre en évidence, pour nos conditions expérimentales, une destruction partielle de l'activité amylasique initiale au cours du séchage (pertes allant jusqu'à 30 p. 100) et au cours du stockage à 31°C en fonction de l'humidité relative (pertes pouvant atteindre 50 p. 100). Le maltose paraît présenter un effet protecteur. Ce phénomène est à rapprocher de l'observation, faite par Poisson, Begué et Bourbon (1957), d'une diminution de l'activité alpha-amylasique des farines au cours du stockage à 35°C, d'autant plus forte que l'humidité est plus élevée. En outre, en raison de cette perte partielle d'activité, l'étude de l'amylolyse en fonction de l'activité de l'eau ne peut guère avoir qu'un aspect semi-quantitatif.

Dans le milieu enzyme-substrat, pour des activités de l'eau ne permettant que des modifications relativement lentes, nous avons pu confirmer un phénomène entrevu par Kiermeier et le préciser dans une certaine mesure : la teneur en glucides extractibles à l'alcool à 80 p. 100 s'accroît, puis diminue et se stabilise ou augmente à nouveau si l'humidité relative est suffisante en raison d'une formation prépondérante de maltose. Ces faits pourraient être interprétés comme la manifestation de réactions de transfert et de la formation du complexe enzyme-substrat. Nos expériences restent encore fragmentaires sur ce point ; des recherches nouvelles doivent être effectuées, dans des conditions opératoires aussi précisées que possible, pour vérifier ces hypothèses.

La formation d'une quantité appréciable de maltose nécessite une quantité minimale d' « eau solvante » dans le milieu.

On confirme les résultats de Kiermeier et Coduro, indiquant que la vitesse de libération des produits de dégradation est d'autant plus grande que la tension de vapeur d'eau est plus élevée.

L'étude de la vitesse initiale d'amylolyse en fonction de la température n'a pu être développée en raison des difficultés expérimentales, mais il semble qu'aux humidités relatives voisines de 90 p. 100, le Q_{10} de la réaction soit de l'ordre de 2,4 à 2,6, valeurs comparables à celles signalées habituellement pour les réactions enzymatiques en milieu très hydraté.

D'une façon générale, les résultats obtenus font apparaître la complexité des phénomènes :

— la structure du substrat et des produits formés au cours de la dégradation enzymatique pouvant se modifier en fonction du temps ;

— la quantité d'« eau solvante » étant susceptible d'augmenter au fur et à mesure que l'amylolyse se poursuit ;

— ces modifications étant, par ailleurs, capables d'intervenir sur le cours de l'action enzymatique.

Nous avons confirmé l'existence d'une limite de la bêta amylolyse, variable avec l'activité de l'eau du milieu. Il existe apparemment une corrélation entre ces valeurs limites et la quantité d' « eau solvante » présente dans le milieu ; tout se passe comme si :

— cette corrélation est indépendante de la température ;

— la quantité d' « eau solvante » nécessaire pour libérer le maltose s'accroît, au fur et à mesure de l'augmentation de la teneur en maltose du milieu.

Cette limitation de l'amylolyse a pu être interprétée en supposant une dégradation topochimique : aux points de contact de l'enzyme avec le substrat, il se produirait, en raison de la rigidité du milieu, un accroissement local de la concentration en maltose, une diminution de la disponibilité de l'eau et un déplacement très limité de l'enzyme par rapport au substrat.

Cette hypothèse est étayée par le fait que :

— l'addition initiale de maltose ne modifie pas sensiblement la valeur limite de l'amylolyse ; c'est en effet la concentration locale qui doit intervenir et non la concentration globale ;

— la modification par séchage et broyage de la texture d'un milieu ayant atteint l'équilibre d'amylolyse, permet une nouvelle formation de maltose, vraisemblablement en changeant la répartition de l'enzyme par rapport au substrat.

Nous pensons qu'une telle explication peut être étendue aux observations faites antérieurement. Peut-être serait-il intéressant en outre de rapprocher ces faits de certains phénomènes intervenant en particulier dans les graines au cours de traitements comme la vernalisation, ou après séchage, et de l'accroissement d'activité de certains enzymes après broyage de milieux naturels.

De même, la mise en évidence de l'influence du mode d'hydratation sur la vitesse et la limite de la bêta-amylolyse, à une activité de l'eau voisine de 1, peut vraisemblablement aider à la compréhension de l'évolution d'actions enzymatiques dans certains produits naturels.

Les résultats que nous avons obtenus nous ont amenés aux conclusions suivantes :

a) Il n'existe pas d'activité de l'eau spécifique pour le démarrage d'une action enzymatique. Ce qui intervient, c'est la quantité d' « eau solvante » présente dans le milieu ; quantité que l'on peut déduire de l'isotherme de sorption.

b) Selon le type de cristalloïde présent dans le milieu, la vitesse et la limite de réaction peuvent être très différentes.

C. — Comportement de l'alpha amylase en fonction de l'activité de l'eau

Les expériences effectuées jusqu'à présent avec l'alpha amylase sont fragmentaires. Elles ont surtout eu pour objet de comparer dans les milieux peu hydratés, le comportement de cet enzyme à celui de la bêta amylase.

Les essais ont porté sur un mélange, effectué à sec, d'amidon soluble et de préparation d'alpha amylase.

En suivant, par chromatographie et dosage à l'anthrone, la formation de l'ensemble des produits alcoolo-solubles en fonction du temps et de l'humidité relative à 31°C, on a pu mettre en évidence les points suivants (tableau 28, fig. 24 et 25) :

TABLEAU 28

Accroissement en fonction du temps, de la teneur en glucides extractibles par l'alcool à 80 p. 100 (exprimée en glucose p. 100 de la substance sèche), pour diverses activités de l'eau à 31°C. (Teneur initiale : 0,25 p. 100.)

Temps en heures	Activités de l'eau					
	0,802		0,915		0,95	
	H_2O p. 100 de la substance sèche	« Glucose » formé	H_2O p. 100 de la substance sèche	« Glucose » formé	H_2O p. 100 de la substance sèche	« Glucose » formé
1			22,40	0	21,85	0,21
2					34,85	1,55
4	18,30	0,04	33,20	1,10	50,00	5,60
7	20,10	0,05				
8			39,35	3,00	67,70	12,60
10	21,40	0,20				
15	19,50	0,10				
16			45,70	6,65	85,40	23,55
24	22,70	*0,40*				
72			51,20	*13,00*	134,80	39,45
120	19,45	*0,50*				
144			52,80	*13,13*	139,00	54,75
240	20,80	*0,55*				

1° *Évolution quantitative des glucides alcoolo-solubles au cours de l'alpha amylolyse, pour des humidités relatives croissantes.*

a) L'*apparition des produits de dégradation* est décelable à partir d'une activité de l'eau de 0,75-0,80, au bout d'un temps relativement court (fig. 24).

On envisage, ultérieurement, d'examiner ce qui se passe au cours de temps beaucoup plus longs et pour des humidités relatives plus faibles ; mais on peut déjà dire qu'en fonction de l'humidité relative, dans des milieux comparables, l'alpha et la bêta amylolyses apparaissent sensiblement en même temps.

b) *Pour une activité de l'eau donnée*, en particulier à 0,80 et 0,91, on aboutit, comme dans le cas de la bêta amylolyse, à une valeur limite de la quantité de produits

alcoolo-solubles formés. Par contre, il semble que pour une activité de l'eau de l'ordre de 0,95, cette fraction alcoolo-soluble continue à s'accroître lentement en fonction du temps.

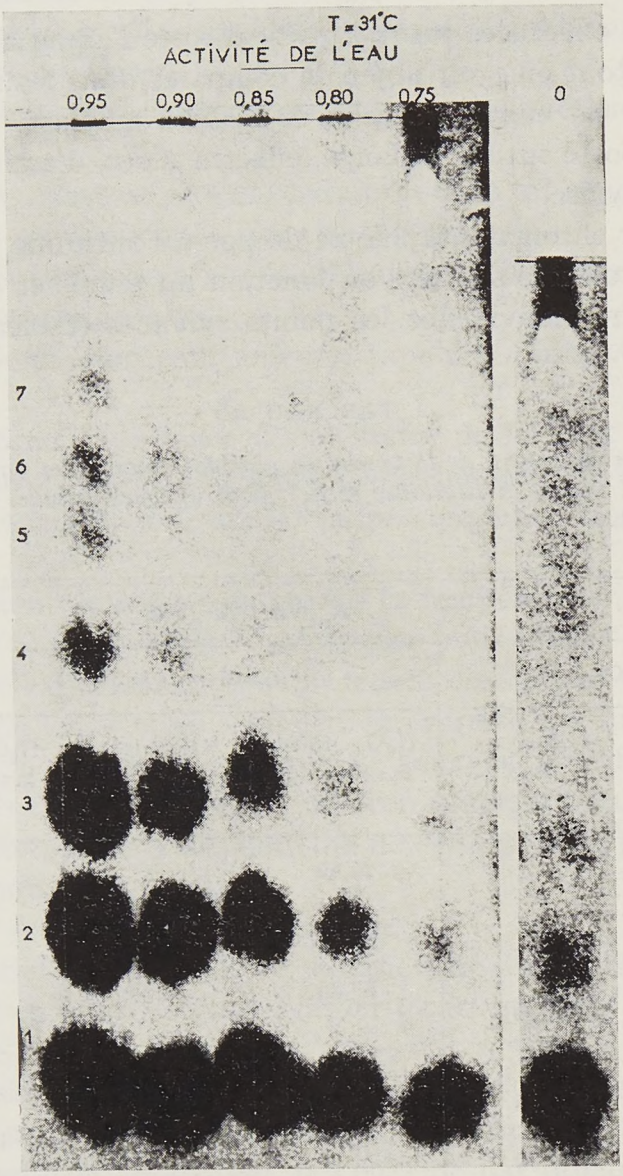


FIG. 24. — *Chromatogrammes de l'alpha amylolyse en fonction de l'activité de l'eau à 31°C, au bout de 24 h; (concentration en préparation d'alpha amylase : 10 p. 100 par rapport à l'amidon sec).*

Chromatogrammes obtenus à partir d'extraits alcooliques :
Solvant : Butanol-pyridine-eau (1-1-1),
Révélateur : Trichloracétate de benzidine.
1 : glucose, 2 : maltose, 3 : maltotriose, 4 : maltotétraose (?), 5 : maltopentaose (?), 6 : maltohexaose (?), 7 : amyloheptaose (?).
(Prélèvements correspondant à 0,075 g d'amidon initial pour les taches des essais 0 — 0,75 — 0,80 — 0,85 et à 0,025 g pour les taches 0,90 et 0,95.)

2° *Évolution qualitative des glucides alcoolo-solubles, au cours de l'alpha amylolyse* (*fig.* 24 *et* 25).

La chromatographie montre que :

— pour les activités de l'eau de l'ordre de 0,80, on n'observe pratiquement que la formation de glucose, maltose et maltotriose, ce dernier disparaissant du reste progressivement en fonction du temps (fig. 25) ;

— à une activité de l'eau de 0,90, le glucose, le maltose et le maltotriose prédominent au début de la réaction ; il se forme en même temps une faible quantité d'oligoholosides de poids moléculaire plus élevé (taches 4,5,6 et 7), les composés 4 et 6 étant les plus importants de ce groupe.

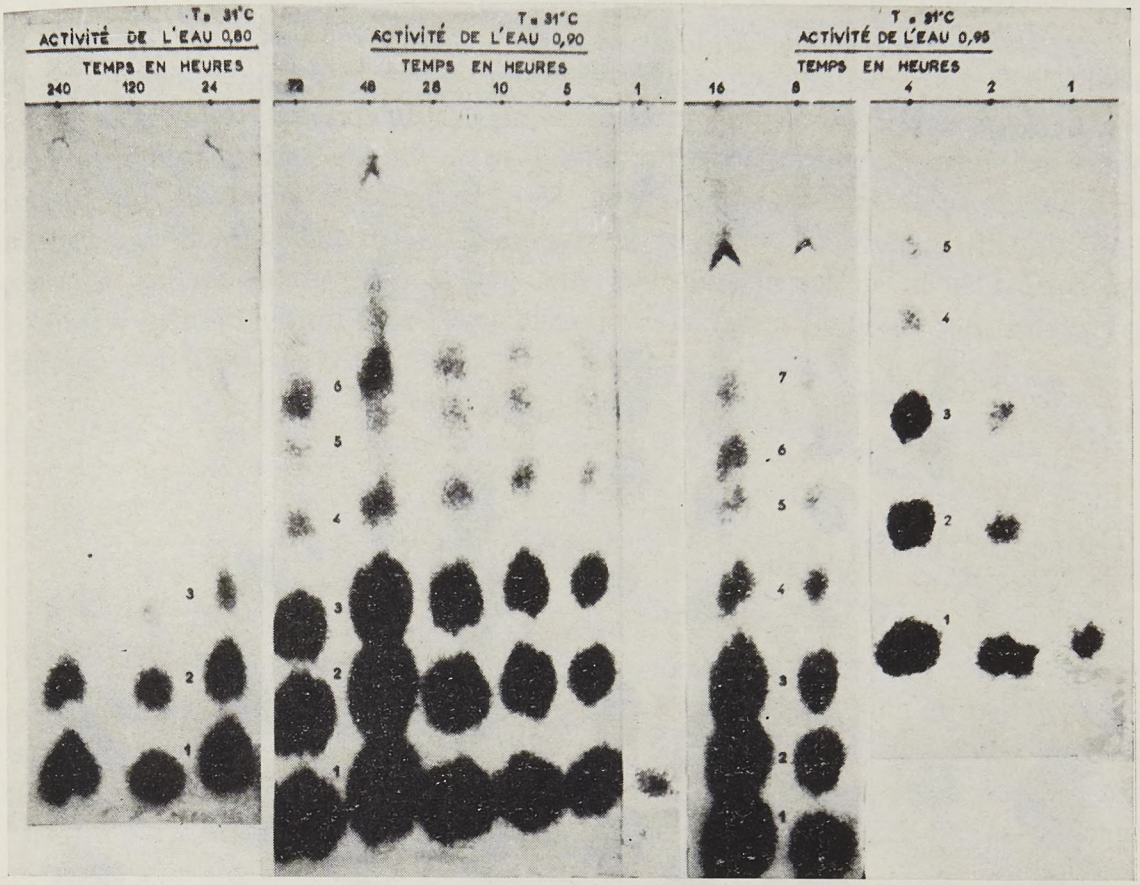


FIG. 25. — *Chromatogrammes de l'alpha amylolyse en fonction du temps pour des activités de l'eau de* 0,80, 0,90 *et* 0,95 *à* 31°C. (*Concentration en préparation d'alpha amylase* : 10 *p.* 100 *par rapport à l'amidon sec*)
Chromatogrammes obtenus à partir d'extraits alcooliques :
Solvant : Butanol-pyridine-eau (1-1-1),
Révélateur : Trichloracétate de benzidine.
1 : glucose, 2 : maltose, 3 : maltotriose, 4 : maltotétraose (?), 5 : maltopentaose (?), 6 : maltohexaose (?), 7 : amyloheptaose.
(Prélèvements correspondant à 0,054 g d'amidon initial pour les taches des essais à 0,80 d'activité de l'eau et à 0,014 g pour les autres.)

N. B. — Dans les différents chromatogrammes présentés, on ne peut estimer la quantité des différents oligoholosides formés à partir de l'intensité des taches car, dans les conditions opératoires utilisées, on n'a aucune relation de proportionnalité entre l'intensité de coloration et la quantité de glucide présent.

On observe, pour une activité de l'eau de 0,95, une évolution comparable à celle précédemment décrite, les quantités libérées étant seulement plus importantes.

Ce schéma d'amylolyse en milieu peu hydraté est sensiblement différent de celui obtenu avec le même type d'enzyme en milieu aqueux, à la même concentration enzyme/substrat que dans les essais précédents (fig. 26). Dans ce cas, les oligoholosides à chaînes relativement longues apparaissent dès le début, alors que la quantité de glucose formé est pratiquement négligeable (1) ; c'est ainsi qu'au bout d'une

(1) Une faible quantité de glucose ayant été mise en évidence dans le substrat, il n'est pas possible d'affirmer qu'une partie du glucose décelé au bout d'une minute, provienne de l'amylolyse.

minute on a prédominance de maltose, de maltotriose et des produits 6 et 7. On a ensuite accroissement de la quantité des différents composés libérés, y compris le glucose. Puis, au fur et à mesure que l'amylolyse progresse, le produit 7 disparaît, ainsi que les composés 6, 5 et 4. Il semble que les oligoholosides alcoolo-solubles prédo-

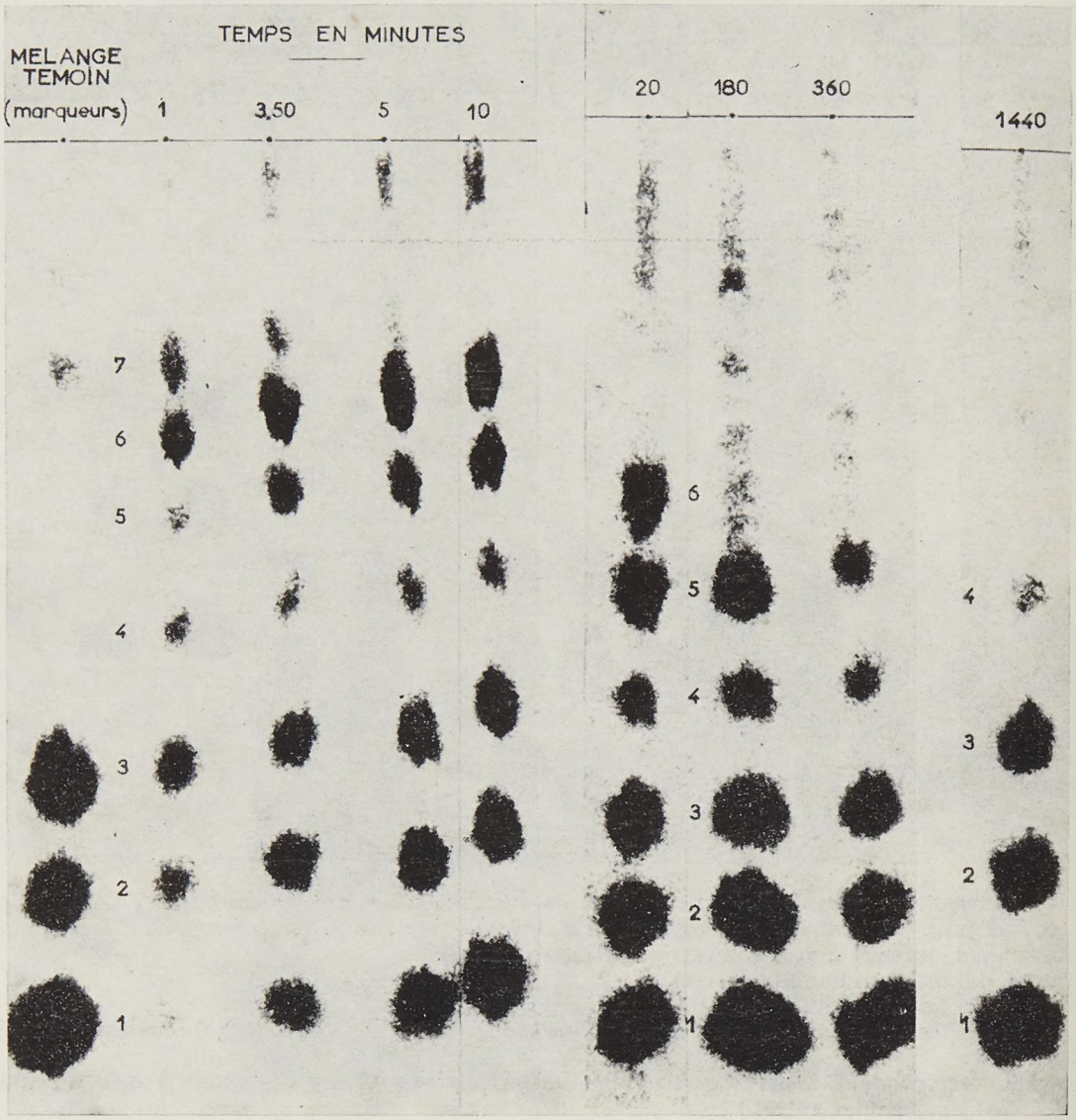


FIG. 26. — *Chromatogrammes de l'alpha amylolyse en solution diluée, en fonction du temps à* 31°C ; (*Concentration en préparation d'alpha amylase* : 10 *p.* 100 *par rapport à l'amidon sec*)
Chromatogrammes obtenus à partir d'extraits alcooliques :
Solvant : Butanol-pyridine-eau (1-1-1),
Révélateur : Trichloracétate de benzidine.
1 : glucose, 2 : maltose, 3 : maltotriose, 4 : maltotetraose (?), 5 : maltopentaose (?), 6 : maltohexaose (?), 7 : amyloheptaose.
(Prélèvements correspondants à 0,0042 g d'amidon initial pour les taches des essais de 1 à 180 mn et à 0,0017 pour les autres).

minant en milieu aqueux en fin d'amylolyse par l'alpha amylase bactérienne soient les trois oligoholosides de poids moléculaire le plus faible.

Le mode d'action observé en milieu peu humide sur un empois cryodéshydraté est à rapprocher par contre de celui obtenu avec de l'amidon cru en suspension dans l'eau ; ce type d'action a été attribué à la dégradation sélective des chaînes les plus externes du grain aboutissant à la formation de produits de faible poids moléculaire.

glucose, maltose et maltotriose en particulier (NORDIN et KIM, 1960) ; (MERCIER et GUILBOT, 1961).

L'évolution que nous avons observée dans nos conditions opératoires peut s'expliquer en faisant l'hypothèse qu'aux faibles hydratations, en raison de la rigidité du milieu, l'alpha amylase ne pourrait attaquer les chaînes glucosidiques que dans une zone restreinte, située au voisinage du point de contact initial enzyme-substrat, qui se situerait à la partie la plus extérieure des chaînes. Au fur et à mesure que l'humidité relative augmente, la mobilité des constituants devenant plus importante, la progression de l'enzyme dans le substrat peut s'effectuer, ce qui se traduit alors par une libération d'oligoholosides de poids moléculaire plus élevé. Ainsi, pour une activité de l'eau de 0,95, en raison de cette diffusion et du fait que la viscosité du milieu tombe plus rapidement que dans le cas de la bêta amylolyse, on n'observe plus de limite de l'amylolyse mais un accroissement lent des produits de dégradation (tableau 28).

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Dans le but d'élucider, au moins partiellement, les différents problèmes posés par l'évolution de l'action amylolytique dans des milieux solides peu hydratés, nous avons été amené à fixer des conditions expérimentales mieux définies que celles utilisées par les auteurs ayant antérieurement effectué des recherches dans ce domaine.

La plupart des techniques que nous avons employées ont été spécialement adaptées en vue de l'étude de l'évolution de ces milieux.

Nous avons utilisé des préparations de bêta et d'alpha amylase purifiées, le substrat étant constitué d'amidon soluble standard de MERCK.

Les conditions opératoires mises au point pour la préparation des mélanges enzyme-substrat tendent à obtenir un milieu présentant initialement le minimum de produits de dégradation, pour éviter de perturber l'évolution ultérieure :

— mélange des solutions et blocage de l'enzyme, à basse température, suivis d'une déshydratation par sublimation de la glace, technique dont les avantages ont été également mis a profit par ACKER (1959) dans son travail sur les phospholipases ;

— mélange à sec du substrat et de la préparation enzymatique offrant à l'état cryodéshydraté des surfaces spécifiques très importantes.

Nous avons précisé, autant qu'il nous a été possible, les conditions de réhydratation des constituants des milieux réactionnels, soit séparés, soit en mélange, en particulier pour suivre l'évolution de l'amylolyse. Il n'est pas douteux cependant que, dans l'avenir, des améliorations doivent encore être apportées à ces techniques.

Nous avons étudié les modalités d'extraction par l'alcool à 80 p. 100 et le dosage des produits de dégradation de l'amidon par la bêta-amylase ainsi que l'isolement des oligoholosides formés au cours de l'alpha-amylolyse. En particulier :

— nous avons apporté des perfectionnements à la technique de chromatographie, permettant une meilleure résolution des taches, une sensibilité de détection plus grande, une reproductibilité parfaite des Rf relatifs, facilitant l'élution quantitative ;

— nous avons amélioré les conditions de dosage des sucres par la méthode colorimétrique au phénol.

Les recherches que nous avons poursuivies ont été beaucoup plus détaillées dans le cas de la bêta amylolyse que dans le cas de l'alpha amylolyse :

1° L'affinité pour l'eau des milieux et de leurs constituants a été déterminée par la méthode de sorption et les courbes examinées d'après l'interprétation de Guilbot et Lindenberg (1960) distinguant une « eau solvante » et une « eau non solvante ».

2° L'examen du comportement du mélange bêta amylase-substrat en fonction de l'activité de l'eau a montré :

— une destruction partielle de l'activité amylasique au cours du séchage et du stockage ;

— dans la zone des faibles activités de l'eau, une évolution de certains constituants glucidiques du milieu qui suggère l'existence de réactions de transfert et éventuellement la formation du complexe enzyme-substrat ;

— la nécessité d'une quantité minimale d' « eau solvante », pour le démarrage de l'amylolyse ;

— l'augmentation de la vitesse de libération du maltose avec l'activité de l'eau, ce qui confirme les résultats de Kiermeier et Coduro (1954 *a*), et avec la température, selon la loi habituelle du Q_{10} pour les réactions enzymatiques ;

— une évolution, aux humidités relatives élevées, comparable à une série de réactions en chaîne : la formation de produits de dégradation entraînant un accroissement de l'affinité du milieu pour l'eau, une augmentation de la mobilité des constituants réactionnels et une nouvelle dégradation du substrat.

3° Nous avons confirmé les observations faites par d'autres auteurs, concernant l'existence d'une limite de la réaction enzymatique pour une activité de l'eau déterminée, et émis l'hypothèse que ce fait résulterait d'un mode de réaction topochimique et d'une diffusion trop faible des produits en cause, en raison de la rigidité du milieu.

4° Nous avons formulé l'hypothèse qu'indépendamment de leur effet possible d'activation ou d'inhibition, les cristalloïdes influent sur le démarrage de l'amylolyse dans la mesure où ils augmentent la quantité d' « eau solvante » dans le milieu.

5° Nous avons montré que : — toutes conditions égales, l'alpha amylolyse démarre sensiblement pour la même activité de l'eau que la bêta amylolyse ;

— l'évolution qualitative et quantitative des produits de dégradation formés par l'alpha-amylase dans les milieux peu humides est différente de celle observée dans les milieux très hydratés.

En conclusion, il semble que dans le cas de l'amylolyse, on puisse, en première approximation, fixer le seuil de démarrage de l'action enzymatique d'après l'allure de la courbe de sorption du milieu, à partir de l'existence d'une quantité minimale d' « eau solvante ».

La réaction serait localisée aux points de contact de l'enzyme et du substrat en raison de la rigidité du milieu, et aboutirait ainsi à une limite. L'augmentation de la température et de l'hydratation, facteurs susceptibles de fournir plus de mobilité au milieu, accroîtrait la vitesse de l'amylolyse et sa valeur limite.

De nouvelles expériences sont encore nécessaires pour étayer ces hypothèses, les généraliser à d'autres enzymes, et voir dans quelle mesure elles s'étendent aux milieux naturels.

SUMMARY

A CONTRIBUTION TO THE STUDY OF ENZYME ACTION IN MODERATELY HYDRATED BIOLOGICAL MEDIA : THE BREAK-DOWN OF STARCH BY AMYLASES IN RELATION TO WATER ACTIVITY AND TEMPERATURE

Research has been carried out on the effects of relative humidity and temperature on the individual behaviour of alpha and beta amylases present in sample mixtures, with the object of determining the connection between moisture and enzyme action during the storage of certain agricultural and food products.

Results show in particular that the initiation of the amylolytic reaction will take place only in the presence of a minimum amount of environmental « solvent water », and that amylolysis tends to proceed to considerably higher limits as the activity of the water increases. There appears to be a correlation which is independent of temperature between these limits and the amount of « solvent water » present in the medium. The amylolytic limit is probably determined both by the conditions pertaining to a topochemical reaction and by a restriction of diffusion of the breakdown products owing to a lack of fluidity of the medium.

There is no specific threshold of water activity for the initiation of a given enzyme action, the conditions of onset being strongly influenced by the absorptive properties of the medium constituents, and to some extent by temperature.

The evolution of enzyme action may be forecast from an analysis of sorption isotherms combined with a knowledge of the amount of « solvent water » present in the given medium.

RÉFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ACKER L., 1958 a). The storage of air dried foods as a function of moisture content. *Nahrung*, **2**, 1045-61.

ACKER L., LÜCK E., 1958 b). Über den Einfluss der Feuchtigkeit auf den Ablauf enzymatischer Reaktionen in wasserarmen Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch, Dtsch.*, **108**, 256-269.

ACKER L.,KAISER H., 1959. Influence of humidity on the course of enzymic reactions in low moisture foods. *Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch.*, **110**, 349-56.

ACKER L., LÜCK E., 1959. Enzymic changes in grain products are dependent upon moisture. *Getreide u. Mehl*, **9**, 1-5.

BACON J. S. D., EDELMAN J., 1951. The carbohydrates of the Jerusalem artichoke and other compositae. *Biochem. J.*, **48**, 114.

BADENHUIZEN N. P., 1958. Structure, properties and growth of starch granules. *Encyclopedia of plant physiology*. Vol. 6, Springer Verlag, Berlin.

BADENHUIZEN N. P., 1960. Chemistry and Biology of the starch granule. *Protoplasmatologia*. Springer Verlag, Wien.

BEILSTEINS. *Handbuch der Organischen Chemie Vierte Auflage Erstes Ergänzungs-Werk*, **1**, 266.

BENEZECH C., 1958. *Physico-chimie Biologique et Médicale*. Masson et Cie, éditeurs, Paris.

BERNFELD P., 1951. Enzymes of starch degradation and synthesis. *Advances in enzymology*, **12**, 379.

BRIGGS D. R., 1931. *J. Phys. Chem.*, **35**, 2914.

BRIGGS D. R., 1932. *J. Phys. Chem.*, **36**, 367.

BROOKS J., 1943. *J. Soc. Chem. Ind.*, **62**, 137.

BROOKS J., 1934. *Proc. Roy. Soc.* (B), **114**, 258. In Fundamental aspects of the deshydratation of foodstuffs. *Soc. of Chemical Ind.*, London (1958).

BRUNAUER S., EMMETT P. H., TELLER E., 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 309-319.

BRUNAUER S., 1943. *The adsorption of gases and vapors. I. Physical adsorption.* Princeton University Press Princeton.

CHAMPETIER G., 1948. *Les molécules géantes et leurs applications.* Editions Albin Michel, Paris.

CHARGAFF E., LEVINE C., GREEN C., 1948. Demonstration by chromatrography of nitrogenous lipide constituents, S. contg. amino acids, and reducing sugars. *J. Biol. Chem.*, **175**, 67.

CIFFONELLI J. A., SMITH F., 1954. Identification des holosides sur chromatogrammes par oxydation périodique. *Analyt. Chem.*, **26**, 1132.

COURTOIS J. E., PERLES R., 1959. *Précis de Chimie Biologique* I. Masson et Cie, éditeurs. Paris.

COWIE J. M. G., GREENWOOD C. T., 1957. Physicochemical studies on starches. Part V : The effect of acid on potato starch granules. *J. Chem. Soc.*, 2558-65.

COWIE J. M. G., GREENWOOD C. T., 1958. *J. Chem. Soc.*,2629-31.

CRAMER F., 1953. *Papier Chromatographie.* Verlag Chemie, 70.

CROCKER W., BARTON L. V., 1957. *Physiology of Seeds.* An introduction to the experimental study of seed and germination problems. Published by the Chronica Botanica Company Waltham, Mass. U. S. A.

CUENDET L. S., *et al.* 1954. The influence of moisture content and other factors on the stability of wheat flours at 37,8°C. *Cereal Chem.*, **31**, 362.

DEDONDER R., 1960. *Monographies de Chimie Organique.* III. Chromatographie en Chimie organique et Biologique. Vol. II, 31. Masson et Cie, éditeurs. Paris.

DICKSON J. G., GEDDES W. F., 1949. Effect of wheat class and germination moisture and time on malt yield and amylase activity of malted wheat. *Cereal Chem.*, **26**, n° 5, 404.

DIEMAIR W., 1948. *Z. Lebensem. untersuch, u. Forsch.*, **88**, 58.

DRAPRON R., 1961 *a*). Chromatographie sur papier avec gradient d'évaporation de la phase mobile. Communication à la *Section de Chimie Analytique de la Soc. Chim. de France.*

DRAPRON R., 1961 *b*). État actuel de nos connaissances sur l'action des amylases en panification, biscotterie et biscuiterie. *Ind. Alim. Agr.*, **3**, 273-283.

DUBOIS M., *et al.* 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28** 350.

DUCLAUX J., 1934. Etude de l'eau et des solutions. in *Traité de Chimie Physique appliquée à la Biologie*, Vol. I, Hermann, Paris.

EDSALL J. T., WYMAN J., 1958. *Biophysical Chemistry.* Vol. I, Academic Press Inc. Publisher, New York.

EVENARI M., 1957. Problèmes Physiologiques de la germination. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég.*, **3**, n° 4, 105-121.

FLEURY P., COURTOIS J., 1948. *Les diastases.* Armand Colin, éditeur, Paris.

FRENCH D., 1960. Determination of starch structure by enzymes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **42**, 1677-1700.

GIRI K. V., NIGAM U. N., 1953. *Naturwissenschaften*, **40**, 343.

GLASS R. L., 1958. Grain storage studies. XXVII. Identification of reducing sugars, glycerol, and inositol in wheat stored under nitrogen. *Program. 43rd. Annual Meeting*, April, **7**, 11-21.

GORDON H. T., THORNBURG, WERUM L. N., 1956. Rapid paper chromatography of carbohydrates and related compounds. *Analyt. Chem.*, **28**, 849.

GORTNER R. A., 1949. *Outlines of Biochemistry.* John Wiley and Sons, Inc., New York. Chapman et Hall Limited London.

GOTTSCHALK A., 1958. The enzymes controlling hydrolytic, phosphorolytic and transfer reactions of the oligosaccharides. in *Encyclopedia of plant physiology*, Vol. **6**, 86-124, Springer Verlag, Berlin.

GUILBOT A., 1949. Généralités sur le dosage de l'eau dans les substances biologiques. *Compt. rend. Acad. Agr. de France*, **35**, 694-698.

GUILBOT A., DRAPRON R., 1950-1957. (Résultats inédits.)

GUILBOT A., 1952. Le problème de l'eau « liée » dans les colloïdes biologiques. *Ind. Agr. et Alim.*, **1**, 7-13.

GUILBOT A., 1957. Application de la cryodessiccation aux aliments. *Bull. Soc. Sci. Hyg. Alim.*, **45**, 10-12.

GUILBOT A., 1958 *a*). Détermination de la teneur en eau des céréales. *Cahiers techniques du C. N. E. R. N. A.* III. Les méthodes analytiques des céréales, 171-186.

GUILBOT A., 1958 *b*). (en liaison avec le Laboratoire de Microcalorimétrie du professeur CALVET.) (Résultats inédits.)

GUILBOT A., *et al.* 1960 *a*). L'eau de sorption de l'amidon : étude par spectrologie hertzienne. *Die Stärke*, **11**, 327-332.

GUILBOT A., LINDENBERG A. B., 1960 *b*). Eau non solvante et eau de sorption de la cellule de levure. *Biochim. Biophys. Acta.*, **39**, 389-397.

GUILBOT A., 1961 *a*). État actuel de nos connaissances sur certains aspects de la physico-chimie de l'amidon. Incidence en technologie des produits alimentaires à base de céréales. *Ind. Agr. et Alim.*, **3**, 205-218.

GUILBOT A., CHARBONNIÈRE R., DRAPRON R., 1961 *b*). Sur la contribution de l'eau à l'organisation des chaînes macroléculaires de l'amidon. *Die Stärke*, **6**, 13, 204-207.

HARPER J. C., TAPPEL A. L., 1957. Freeze drying of Food Products. *Adv. in Food Research*, VII, 172-239.

HARRIS G., MAC WILLIAM I. C., 1954. Dipping technique for revealing sugars on paper chromatograms. *Chem. and Ind.*, (London), 249.

HEISS R., 1950. *Lebensmitteltechnologie I.* Aufl., S 206 München, Bergmann.

HERMANS P. H., 1949. *Physics and chemistry of cellulose fibers.* Elsevier Publishing Compagny Inc.

HERMANS P. H., 1952. *Contribution à l'étude physique des fibres cellulosiques*, Dunod éditeur, Paris.

HNOJEWYJ W. S., REYERSON L., 1959. The sorption of H_2O and D_2O by lyophilized lysozyme. *J. Phys. Chem.*, **63**, 1653.

HORROCKS R. H., 1949. Paper partition chromatography of reducing sugars with benzidine as a spraying reagent. *Nature*, **164**, 444.

HUNT S. M. V., MATHESON N. A., 1959. The relation between the quality of dehydrated raw beef and the adenosine-triophosphate activity after storage at various moisture contents. *Food. Research*, **24**, 262-7

ISEMURA T., FUJITA S., 1957. Etudes physicochimiques sur la taka-amylase A. II. Sur le caractère compact et sur l'hydratation de la molécule. *J. Biochem. Jap.*, **44**, 797-805.

ISHERWOOD F. A., JERMYN M. A., 1951. Relationship between the structure of the simple sugars and their behaviour on the paper chromatogram. *Biochem. J.*, **48**, 515.

JACQUOT R., MAYER A., 1925. Équilibre des constituants cellulaires, intensité des oxydations de la cellule dans les graines. *C. R. Ac. Sc.*, **181**, 933.

JACQUOT R., MAYER A., 1926. Hydratation et respiration des graines. *Ann. Physiol. et Physico-chimie*, **11**, 408-425.

JEANES A., WISE C. S., DIMLER R. J., 1951. Improved techniques in paper chromatography of carbohydrates. *Analyt. Chem.*, **23**, 415.

KATZ J. R., 1917. *Kolloïd chem., Beihefte*, **9**, 1.

KIERMEIER F., TAUFEL K., 1938. *Fette u. Seifen*, **45**, 487.

KIERMEIER F., CODURO E., 1954 *a*). Sur la dégradation enzymatique de l'amidon dans les substances séchées à l'air. *Biochem. Z. Dtsch.*, **325**, 280-287.

KIERMEIER F., CODURO E., 1954 b). Der Einfluss des Wassergehaltes auf Enzym reaktionen in wasserarmen Lebensmitteln. *Z. Lebensem. untersuch, u. Forsch.*, **98**, n° 2, 119-129.

KIERMEIER F., CODURO E., 1955. Der Einfluss des Wassergehaltes auf Enzymreaktionen in wasser armen Lebensmitteln. III. Über Enzymreaktionen in Mehl, Teig und Brot. *z. Lebensm. untersg. Forsch., Dtsch.*, **102**, 1. 7-12.

KIRKWOOD J. G., 1954. The nature of the forces between protein molecules in solution. In *Symposium on the mechanism of enzyme action*, 4-23, The Johns Hopkins press.

KURSSANOV A. L., 1941. Untersuchung enzymatischer Prozesse inder lebenden pflanze. *Advances in enzymology*, **1**, 329-367.

LAIDLAW R. A., WYLAM C. B., 1952. *J. Sci. Food. Agric.*, **3**, 49.

LATHE G. H., RUTHVEN C. R. J., 1956. The separation of substances and estimation of their relative molecular sizes by the use of columns of starch in water. *Biol. J.*, **62**, 4, 665-674.

LEA C. H., HANNAN R. S., 1949. Studies on the reaction between proteins and reducing sugars in the « dry » state. I. The effect of activity of water of pH and temperature on the primary reaction between casein and glucose. *Biochem. and Biophys. Acta.*, **3**, 313-325.

LINDENBERG A. B., ZUILI S., 1952. Proportion de l'eau liée non solvante dans la cellule de levure. *C. R Acad. Sci., Paris*, **134**, 2573.

LINKO P., 1960. *Ann. Acad. Sci. Fennicae.*, A. II, 98.

LINKO P., MILNER M., 1960. *Plant Physiol.*, **35**, 68.

LINKO P., 1960. The biochemistry of grain storage. *Cereal Sci. to day*, **5**, 10, 302-306.

LINTNER C. J., 1886. *J. prakt. chem.*, **34**, 378, 383, 386.

LINTNER C. J., 1888. *J. prakt. chem.*, **36**, 481.

LOEWUS F. A., 1952. Improvement in the anthrone method for determination of carbohydrates. *Anal. Chem.*, **24**, 219.

MAC CANCE, WIDOWSON, 1956. Goût « savonneux » des biscuits et des flocons d'avoine. *Biscuit Maker and Plant Baker.*

MAC CREADY R. M., MAC COMB E. A., 1954. Determination of sugars on paper chromatograms. *Analyt. Chem.*, **26**, 1645.

MALMON A. G., 1957. Small angle X ray scattering studies of the size shape and hydratation of catalase. *Bioch. Bioph. Acta.*, **26**, 233-241.

MASHKOVCEV M. F., VOLGUNOV G. P., POKHNO M. T., 1951. Influence des substances hygroscopiques accompagnant les enzymes, sur les substrats en équilibre avec l'humidité atmosphérique. *Biokhimija, S. S. S. R.*, **16**, 1, 24-28.

MATSUO Y., NAMBA A., 1956. Critism of the colorimetric phenol-sulfuric acid method for the determination of carbohydrates. I. Glucose and starch. *Bull. Fac. Engr. Hiroshima Univ.*, **5**, 19-24.

MATSUO Y., NAMBA A., 1958. Phénol sufuric-acid method for determining carbohydrates by colorimetry II. Determination of xylose and a rapid analysis of xylose and glucose mixtures. *Hakko Hogaku Zasshi*, **36**, 70.

MATSUO Y., NAMBA A., NANGO, 1959. Critism on the phenol-sulfuric acid method for determining carbohydrates colorimetrically. I. Application to the total sugar determination and the effect of amino-acids on the présent method. *Hakko Kogaku Zasshi*, **37**, 51-4.

MAYER A., PLANTEFOL L., 1925 *a*). Hydratation et respiration chez les mousses. *Ann. Physiol. Phys. Chimie Biol.*, **1**, 239-280.

MAYER A., PLANTEFOL L., 1925 *b*). Sur les échanges d'eau des mousses avec l'atmosphère. *C. R. Ac. Sc. Paris*, **179**, 204.

MAYER A., PLANTEFOL L., 1925 *c*). Hydratation et respiration chez les mousses. Hydratation et nature des phénomènes respiratoires. *Ann. Physiol. et Physico-chimie Biol.*, **1**, 361-393.

MAYER A., PLANTEFOL L., 1926. Teneur en eau des plantes et assimilation chlorophyllienne. Étude l'assimilation des mousses reviviscentes. *Ann. Physiol. et Physico-chimie Biol.*, **11**, 564-605.

MERCIER C., GUILBOT A., 1961. (Résultats inédits).

MEYER K H., BERNFELD P., 1940. *Helv. Chim. Acta*, **23**, 890.

MEYER K. H., BERNFELD P., 1949. *J. Phys. Chem.*, **53**, 319.

MEYER K. H., BERNFELD P , 1952. *Expérientia*, **8**, 405.

MILNER M., CHRISTENSEN C. M., GEDDES W. F., 1947. Grain storage studies. VII. Influence of certain mold inhibitors on respiration of moist wheat. *Cereal Chem.*, **24**, 507.

MYRBÄCK K., WILLSTAEDT E., 1954. Properties of Lintner starches. *Arkiv För Kemi*, **7**, 291-314.

NORDIN P., KIM Y. S., 1960. The reaction of amylases with starch granules. *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 4604.

OPARIN A., 1937. *Enzymologia*, **4**, 13.

OPARIN A., 1937. *Biochimia* S. S. S. R., **2**, 135.

OPARIN A., 1937. *Iswestia, Akad. Nauk. S. S. S. R.* (Ser. biol.) 1733.

OVCHINUIKOW N. N., 1951. Influence de l'eau labilement liée sur l'activité de la catalase. *Biokhimija S. S. S. R.*, **16**, 3, 205-208.

PACAUD H., 1952. État hygrométrique de l'atmosphère dans une cuve fermée contenant de l'eau ou une solution saline. *C. R. Acad. Sci.*, **234**, 722-724.

PARTRIDGE S. M., 1948. Filter paper partition chromatography of sugars. *Biochem. J.*, **42**, 238.

PARTRIDGE S. M., 1949. Aniline H phtalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. *Nature*, **164**, 443.

PAULING L., 1948. *The nature of the chemical bond.* Cornell University Press Ithaca, New York.

PAULING L., 1956. *Chimie générale.* Dunod, éditeur, Paris.

PERRY J. H., 1941. *Chemical Engineers' Handbook.* 398. MC GRAW-HILL Book Company, Inc. New York and London.

POISSON J., BÈGUÉ D., BOURBON G., 1957. Conservation de la qualité des farines. Evolution des caractères technologiques des farines conservées en cellules étanches, en fonction de la température et de la teneur en eau. *La Meunerie Française*, **127**, 21.

POISSON J., GUILBOT A., 1959-1960. (Résultats inédits).

POPOV M. P., NELJUBINA G. M., 1958. Rôle des enzymes dans le rancissement des produits céréaliers. *Biokh. Zerna*, **4**, 173-205.

PROKHOROVA A. P., KRETOVICH V. L., 1958. Enzymic processes in stored dry vegetable materials. *Biokhim Zerna, Sbornik*, **4**, 132-137.

RAADSVELD C. W., 1952. Phénomènes de maturation dans les fromages d'Edam, à différentes teneurs en eau et en sel. *Netherl. Milk Dairy, J.*, **6**, n° 3, 342-355.

ROBERTSON D. W., GARDNER R., 1939. Effet de l'humidité relative sur la viabilité, la teneur en eau et la respiration du blé, avoine et orge conservés. *J. Agr. Research*, **59**, 281-291.

ROCKLAND L. B., 1960. Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5° and 40°C. *Annal. Chem.*, **32**, 1375.

ROTHE M., 1955. *Fette, Seifen, Anstrichm*, **57**, 905.

ROTHE M.,1957. Bermerkungen zur Bestimmung der Fermentaktivität luftrockner Substanzen. *Ernährungsforschung*, **2**, 471-474.

SANDSTEDT R. M., 1941. The action of the amylases on wheat starch granules. *Annual meeting A. A. C. C.*

SANDSTEDT R. M., 1946. A. A. C. C. Interscience publishers New York, 88-126.

SANDSTEDT R. M., KNEEN E., BLISH M. J., 1939. A. Standardized Wolgemuth procedure for alpha amylase activity. *Cereal Chem.*, **16**, 712-723.

SANDSTEDT R. M., KNEEN E., BLISH M. J., 1957. *Cereal Laboratory methods of A. A. C. C.*, 6 th edition.

SCOTT T. S., 1953. Bladder tumors in a dye factory *Chem. and Ind.* (London), 1245.

SCOTT W. J., 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. in *Adv. in food Research.* Acad. Press inc. Publisher New York, **7**, 84-123.

SEMENIUK G., 1954. In *Storage of Cereal grains and their products.* A. A. C. C. Publisher, 77-136.

SHIRK H. G., 1942. Freezable water content and the oxygen respiration in wheat and rye grain at different stages of ripening. *Amer. Jour. Bot.*, **29**, 105-109.

SHVETSOVA V. A., SOSEDOV N. I., 1958. Biochemical changes during prolonged hermetic storage of wheat. *Biokhim Zerna, Sbornik.*, **4**, 4229-40.

STARON T., ALLARD C., CHAMBRE M. M., 1961. Application de la méthode de DUBOIS modifiée au dosage des sucres dans les milieux biologiques. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, **252**, 3502-3504.

SWANSON C. O., 1935. *Cereal Chemistry*, **12**, 89.

TAUFEL K., 1944. *Dtsh. Lebensmittel. Rdsh.*, **42**, 17.

TOUZARD J., 1958. Influence de diverses conditions constantes de température et d'humidité sur la longévité des graines de quelques espèces cultivées. *C. R. du XV^e Congrès Int. d'Horticulture.*

VOLGUNOV G. P., 1948. Action of trypsin and the proteolytic pea enzyme on a air dried substrate in various stage of humidity. *Biokhimija*, **13**, 104-108.

VOLGUNOV G. P., POKHNO M. T., 1949. Enzymic decompn. of air dried proteins. *Biokhimija*, **14**, 30

VOLZ F. E., RAMSTAD P. E., 1952. Effects of various treatments upon the amyloclastic susceptibility of starch. *Food. Res.*, **17**, 81.

WHELAN W. J., 1958. Starch and similar polysaccharides. In *Encyclopedia of plant physiology*, **6**, 154-240; Springer Verlag, Berlin.

WHELAN W. J., 1960. The action patterns of alpha amylase. *Die Stärke*, **12**, 358-364.

WHYMPER R., BRADLEY A., 1934. Moisture content of wheat, Influence of speed of germination and vitality. *Cereal Chem.*, **11**, 548.

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1962

P. Barré, P. Galzy. — Étude d'un lactobacille homofermentatif isolé du vin 121

H. Biol, C. Foulonneau. — Recherches sur l'extraction et le dosage de l'acide sorbique dans les vins 131

H. Biol, A. Michel. — Étude chromatographique des vins rouges issus de cépages réglementés 245

P. Brechot, J. Chauvet, H. Girard. — Identification des levures d'un moût de Beaujolais au cours de sa fermentation 235

Y. Collon. — L'hydroxyméthylfurfural dans les jus de raisin. Formation et méthodes de dosage 167

R. Drapron, A. Guilbot. — Contribution à l'étude des réactions enzymatiques dans les milieux biologiques peu hydratés : la dégradation de l'amidon par les amylases en fonction de l'activité de l'eau et de la température. 1re partie 175
2e partie 275

P. Dupuy, J. Maugenet. — Oxydation de l'éthanol par *Acetobacter rancens* 219

E. Duval, L. Hedin. — Recherches sur le drainage des silos de pulpes et de verts de betteraves 69

M. Flanzy, Y. Collon. — Sur la présence de l'hydroxyméthylfurfural dans certains jus de raisins 227

M. Flanzy, Y. Collon. — Sur l'origine de l'hydroxyméthylfurfural de certains jus de raisins 271

D. Hugot, J. Causeret. — Valeur nutritive des protéines du lait stérilisé conservé dans diverses conditions de température et d'exposition à la lumière 55

D. Hugot, M. Lhuissier, J. Causeret. — Effet protecteur des bouteilles de verre ambré contre les pertes de riboflavine et de vitamine A dues à l'exposition du lait stérilisé à la lumière 145

P. Jaulmes, R. Mestres. — Le dosage de l'acide cyanhydrique dans les vins 249

S. Kuzdzal-Savoie. — Les acides gras du beurre. Connaissances actuelles 153

M. Lhuissier, E. Biette. — Évolution de la teneur du lait stérilisé en thiamine et en pyridoxine au cours d'une conservation de longue durée 63

J. Maugenet. — Les *Acetobacter* du cidre. Identification de quelques souches 45

N. Melamed. — Détermination des sucres résiduels des vins, leur relation avec la fermentation malolactique. 1re partie 5
2e partie 107

A. Ournac. — Essais de caractérisation des vins de raisins secs 33

E. Peynaud, G. Guimberteau. — Sur la formation des alcools supérieurs par les levures de vinification 85

Le Directeur-Gérant : M. L. CAGNAC

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 22-12-1962

Dépôt légal : 4e trimestre 1962 *N° d'impression : 189*